

Die post-SELEX Optimierung des Trypanosomen-spezifischen RNA-Aptamers 2-16

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Annette Adler

aus Groß-Gerau

Referent: Prof. Dr. H. Ulrich Göringer

Koreferent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Tag der Einreichung: 31. Mai 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2007

Darmstadt 2007

D17

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Ulrich Göringer am Institut für Mikrobiologie und Genetik des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Darmstadt im Zeitraum von Oktober 2002 bis März 2007 angefertigt.

Teile dieser Arbeit gehen in die folgenden Veröffentlichungen ein:

Göringer, H. U.; Homann, M.; Zacharias, M.; Adler, A. (2006): RNA aptamers as potential pharmaceuticals against infections with African trypanosomes. In: Handbook of experimental pharmacology, H. 173, S. 375–393.

Adler, A.; Forster, N.; Homann, M.; Göringer H. U. (2007): Post-SELEX Chemical Optimization of a Trypanosome-Specific RNA Aptamer. In: Combinatorial chemistry and high throughput screening. (in press)

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
2	EINLEITUNG	7
2.1	Die Entwicklung moderner Therapeutika	7
2.2	Generelle Eigenschaften von Leitsubstanzen	9
2.3	Isolierung von Leitsubstanzen	11
2.4	Nukleinsäureaptamere als therapeutische Moleküle	13
2.5	Nukleinsäureaptamere gegen Trypanosomeninfektionen	17
2.5.1	Parasitäre Erkrankungen – Die Afrikanische Schlafkrankheit	17
2.5.2	Diagnose und Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit	18
2.5.3	RNA-Aptamere gegen trypanosomale Oberflächenproteine	21
2.6	Zielsetzung der Arbeit	24
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Die Stabilität von Aptamer 2-16 in menschlichem Serum	25
3.1.1	Der Einfluss von Ribosemodifikationen auf die Serumstabilität von Aptamer 2-16	25
3.1.2	Der Einfluss von Ribosemodifikationen auf die Bindecharakteristika von Aptamer 2-16	28
3.1.3	Strukturanalysen von 2'-modifizierter 2-16 RNA	32
3.2	PEGylierung der 2-16 RNA	38
3.2.1	Kovalente Verknüpfung von Aptamer 2-16 mit Polyethylenglycol-Derivaten	38
3.2.2	Einfluss der PEG-Modifikationen auf das Bindeverhalten des Aptamers	41
3.3	Modifikation von Aptamer 2-16 mit membranaktiven Substanzen	44
3.3.1	Artifizielle Polymere und Pseudopeptide – Poly (Lysin Dodecanamid) und Poly (Propylacrylsäure)	45
3.3.2	Modifikation von Aptamer 2-16 durch Melittin	48
3.3.3	Modifikation von Aptamer 2-16 durch GALA	53
3.4	Kompetitive Bindeanalysen	62
3.4.1	Kompetition der Bindung von Aptamer 2-16 durch Substanzen einer Naturstoffbibliothek	62
3.4.2	Direkter Nachweis der Aptamer-verdrängenden Substanz auf der trypanosomalen Oberfläche	68
4	DISKUSSION	70
4.1	Die direkte Nutzung von Aptamer 2-16 als therapeutisch aktives Molekül	70
4.1.1	Die Erhöhung der Serumstabilität von Aptamer 2-16 durch Ribosemodifikationen	70
4.1.2	Der Einfluss von 2'-Modifikationen auf Struktur und Funktion von Aptamer 2-16	72
4.1.3	Die Modifikation von Aptamer 2-16 durch PEG-Derivate	77
4.1.4	Der therapeutische Ansatz – membranaktive Substanzen	78
4.1.5	Die nächsten Schritte zum therapeutischen Nutzen von Aptamer 2-16	89

4.2	Die indirekte Nutzung von Aptamer 2-16 zu therapeutischen Zwecken	91
4.2.1	Isolierung von Trypanosomen-bindenden Substanzen durch Aptamer 2-16	91
4.2.2	Der Ausblick – Nukleinsäureaptamere zur Isolierung von Leitsubstanzen	94
5	MATERIALIEN	96
5.1	Chemikalien	96
5.2	Bibliotheken	99
5.3	Zelllinien	99
5.4	Häufig verwendete Puffer und Medien	99
5.4.1	Medien	99
5.4.2	Puffer	100
5.5	Enzyme	100
5.6	Fluoreszenzfarbstoffe und Konjugate	101
5.7	Verbrauchsmaterialien	101
5.8	Geräte	101
5.9	Software	102
6	METHODEN	103
6.1	Mikrobiologische Methoden	103
6.1.1	Bakteriologische Arbeiten	103
6.1.2	Parasitologische Arbeiten	103
6.2	Grundlegende Nukleinsäure-Arbeitstechniken	105
6.2.1	Reinigung und Isolierung von Nukleinsäuren	105
6.2.2	Analyse und Detektion von Nukleinsäuren	107
6.3	DNA-Arbeitstechniken	109
6.3.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	109
6.3.2	Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA	109
6.4	RNA-Arbeitstechniken	109
6.4.1	Synthese von RNA-Molekülen durch T7-Transkription	109
6.4.2	Methoden zur radioaktiven Markierung von RNA-Molekülen	110
6.4.3	Schmelzkurven	111
6.5	Modifikation von RNA-Molekülen	112
6.5.1	Dephosphorylierung von RNA-Molekülen	112
6.5.2	Limitierte alkalische Hydrolyse von RNA-Molekülen	112
6.5.3	Enzymatische Hydrolyse von RNA-Molekülen	112
6.5.4	Chemische Hydrolyse von RNA-Molekülen	112

6.5.5	Oxidation von RNA-Molekülen	113
6.5.6	Modifikation von RNA durch Polyethylenglycol-Derivate	113
6.5.7	Modifikation von Aptamer 2-16 durch Melittin	114
6.5.8	Modifikation von Aptamer 2-16 durch GALA	114
6.6	Organisch-chemische Synthesen und Modifikationen	114
6.6.1	Synthese von Poly(Lysin Dodecanamid)	114
6.6.2	Synthese von Poly(2-Propylacrylsäure)	115
6.6.3	Synthese von 2-Propionsäure-3-Methylmaleinsäureanhydrid	116
6.6.4	Maskierung der primären Aminogruppen von Melittin	116
6.6.5	Terminale Oxidation von Monomethoxypolyethylenglycol und Modifikation durch Spermin	116
6.6.6	Biotin-Modifikation von Quercinsäure	117
6.7	Quantitative Nachweissysteme	117
6.7.1	Analyse der Serumstabilität von RNA	117
6.7.2	Analyse der Bindeparameter von RNA-Aptameren	118
6.7.3	Nachweis lebender Trypanosomenzellen	118
6.7.4	Nachweis primärer Aminogruppen	118
6.7.5	Nachweis der Lyse von humanen Erythrozyten	119
7	LITERATUR	120
8	ABKÜRZUNGEN	134
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	136
10	LEBENS LAUF	137
11	DANKSAGUNG	138

1 Zusammenfassung

RNA-Aptamere sind biopolymere Verbindungen mit hochaffinen Bindeeigenschaften für spezifische Zielmoleküle. Sie stellen eine neue Stoffklasse bei der Entwicklung moderner Therapeutika dar und können sowohl direkt als auch indirekt zur Therapeutikaentwicklung eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Strategien am Beispiel des Trypanosomen-spezifischen Aptamers 2-16 verfolgt:

Ein direkter Einsatz von Aptamer 2-16 als trypanozide Substanz erfordert die Optimierung seiner pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften. Aus diesem Grund wurden pharmakologisch relevante Charakteristika von Aptamer 2-16 moduliert.

Hierzu wurde die nukleolytische Stabilität des Aptamers im menschlichen Serum durch die Inkorporierung von 2'-F- und/oder 2'-NH₂-substituierten Pyrimidin-nukleotiden auf Halbwertszeiten von bis zu mehreren Tagen erhöht. Die funktionelle Analyse der 2'-modifizierten Aptamer-Varianten zeigte, dass ausschließlich 2'-F-dC/dU-substituierte Aptamer-Präparationen eine vergleichbare Bindeaffinität zu der des unmodifizierten Aptamers aufwiesen. Strukturanalysen belegten, dass die 2'-F-dC/dU-Modifikationen keinen signifikanten Einfluss auf die strukturelle Integrität des Aptamers ausübten, jedoch die thermische Stabilität des Moleküls erhöhen.

Aptamer 2-16 wurde fortführend mit Polyethylenglycol-Derivaten unterschiedlicher molekularer Massen verknüpft. Die Aptamer-Konjugate zeigten im Vergleich zum unmodifizierten Aptamer einen größenabhängigen Rückgang in ihrer Affinität.

Die Konversion des Aptamers von einer *in vitro* bindenden Substanz hin zu einem therapeutisch aktiven Molekül erfolgte durch die kovalente Verknüpfung der RNA mit membranaktiven Substanzen. Ein Peptid~RNA-Konjugat wurde synthetisiert, das aus Aptamer 2-16 und dem membranaktiven Peptid GALA bestand. Dieses Konjugat wies eine Bindung an die trypanosomale Oberfläche auf und zeigte einen konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt auf Trypanosomenzellen.

Ein indirekter pharmazeutischer Einsatz von Aptameren besteht in der Isolierung neuer therapeutischer Leitsubstanzen.

Hierbei wurde Aptamer 2-16 genutzt, um Substanzbibliotheken nach Molekülen zu durchsuchen, welche dieselben Bindeeigenschaften wie das Aptamer aufweisen. Dies wurde mit Hilfe von Verdrängungsexperimenten durchgeführt, in denen die Bindung des Aptamers in Gegenwart von 1028 Substanzen einer Naturstoffbibliothek analysiert wurde. Dabei konnte die Substanz Quercinsäure isoliert werden, die das Aptamer konzentrationsabhängig von der trypanosomalen Oberfläche verdrängt und demselben Bindemodus unterliegt wie das Aptamer.

2 Einleitung

2.1 Die Entwicklung moderner Therapeutika

Die Strategien in der Entwicklung von Therapeutika unterlagen im Laufe des letzten Jahrhunderts einem stetigen Wandel. Traditionell war die medizinische Forschung eng mit der Verwendung von Naturstoffen verknüpft, und noch bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts war die Entdeckung von therapeutischen Wirksamkeiten mehr von „glücklichen Zufällen“ als von gezielter Forschung geprägt. Die ersten pharmakologischen Ansätze in der Arzneimittelentwicklung bestanden in der klinischen und chemischen Untersuchung von pflanzlichen Wirkstoffen und deren Derivate. Diese führten z. B. zur Isolierung von Acetylsalicylsäure (Hoffmann, 1900) oder Penicillin (Fleming, 1929). Viele Wirkstoffe wurden ursprünglich zu anderen Zwecken entwickelt, hier wurden die pharmazeutischen Effekte nur durch Zufall entdeckt. Ein prominentes Beispiel hierfür ist z. B. die Entdeckung der therapeutischen Wirkung von Warfarin (Stahmann *et al.*, 1941), das als Rattengift entwickelt wurde und heute als blutverdünnendes Mittel einen bedeutenden Bestandteil der Therapie von Thrombopatienten ausmacht.

Der Fortschritt in der biochemischen Forschung wurde insbesondere durch die Entwicklung neuer biophysikalischer Analysemethoden vorangetrieben, wie z. B. die UV-, Massen- und Infrarotspektroskopie, sowie Techniken der kernmagnetischen Resonanz. Dies ermöglichte detaillierte Aufklärung von Strukturen und Interaktionen biologischer Moleküle und führte zur Etablierung des Konzepts von Enzymen und Rezeptoren (Langley, 1905). Es konnte empirisch gezeigt werden, dass diese vielversprechende Zielmoleküle für therapeutische Ansätze darstellten. Hierfür wurden endogene Substanzen, deren Wirkungen eher zufällig entdeckt wurden, derivatisiert bzw. chemisch diversifiziert und auf ihre Effekte hin untersucht. Insbesondere die zuerst von Paul Ehrlich aufgestellte Theorie, nach der ein Rezeptor eine selektive Bindestelle für spezifische Liganden, sogenannte Agonisten bzw. Antagonisten darstellt (Ehrlich, 1897), lieferte die Basis für eine Vielzahl von Therapeutika. Beispiele hierfür sind β -Blocker (Ahlquist, 1948), β -Agonisten (Bacq, 1983) und monoklonale Antikörper, die Rezeptoren für ihren natürlichen Liganden blockieren (Buske *et al.*, 1999).

Das Zusammenwirken von Chemie, Pharmakologie, Mikrobiologie und Biochemie lieferte neue Strategien in der Entwicklung moderner Therapeutika. Das stetig größer werdende Verständnis von biologischer Struktur und Funktion führte besonders im Dialog zwischen Chemie und Biologie zu der Entwicklung von neuen chemischen Strukturen als potentiell therapeutisch aktive Moleküle. Der Fortschritt in der Molekularbiologie und im Speziellen die Klonierung und Expression von therapeutisch nützlichen Proteinen vereinfachte die Produktion

von Protein-basierten Therapeutika. Rekombinante Proteine, und im Zuge dieser Entwicklung auch monoklonale Antikörper, wurden so zu einer bedeutenden Wirkstoffgruppe innerhalb der Therapeutika (Drews, 2000). Die größte Bedeutung der Molekularbiologie für die Therapeutikaentwicklung liegt jedoch in der Aufklärung der molekularen bzw. genetischen Mechanismen, die Krankheitsverläufe determinieren, was die Identifizierung von optimalen Zielstrukturen für die Medikation ermöglicht.

Der therapeutische Nutzen von Zielstrukturen erfordert die Isolierung von Leitsubstanzen, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften mit der Zielstruktur interagieren und einen therapeutischen Effekt bewirken. Die Basis für Leitsubstanzen stellen oft natürliche Liganden dar, denen mit Hilfe chemischer Modifikationen antagonistische oder agonistische Eigenschaften verliehen werden können. Somit können Leitsubstanzen als Grundgerüste betrachtet werden, deren Aktivitäten durch systematische Modifizierung von funktionellen Gruppen moduliert werden können. Diese Erkenntnis führte in den Jahren zwischen 1950 und 1990 zu dem sogenannten „golden age of drug research“ (Hirschmann, 1991; Kubiniy, 2004), in denen nahezu jede Modifikation von therapeutisch interessanten Liganden zu einer veränderten Aktivität und Selektivität der Substanz führte. Die veränderten pharmakodynamischen Eigenschaften der modifizierten Substanzen bildeten die Grundlage für die Optimierung von Leitsubstanzen bis hin zu einsatzbereiten Medikamenten.

Die Optimierung von Leitstrukturen kann zum einen auf eine erhöhte Wirksamkeit des Präparats abzielen, allerdings können dabei auch andere Kriterien berücksichtigt werden. Ein Ziel kann z. B. die Reduzierung von Nebenwirkungen darstellen, bei der ein optimales Verhältnis zwischen Wirksamkeit und unerwünschten Seiteneffekten erzielt werden soll. Umgekehrt können Leitsubstanzen neben dem ursprünglich gewünschten Effekt auch Nebenwirkungen aufweisen, die selbst einen therapeutischen Effekt erzielen. Ein prominentes Beispiel hierfür stellt der Wirkstoff Sildenafil dar, der als Therapeutikum gegen idiopathische pulmonale Hypertonie getestet wurde. Einen weitaus größeren Bekanntheitsgrad erlangte das Präparat jedoch erst, als es aufgrund seiner häufig auftretenden Nebenwirkung unter dem Handelsnamen Viagra® (Pfizer) als erstes Medikament zur Behandlung der erektilen Dysfunktion zur Zulassung gebracht wurde (Boolell, *et al.*, 1996).

Die Modifikation von Leitsubstanzen kann auch auf die Generierung von sogenannten „prodrugs“ abzielen. Viele Wirkstoffe zeigen eine hohe therapeutische Aktivität *in vitro*, besitzen jedoch auch chemische oder pharmakokinetische Eigenschaften, die ihre Applikation *in vivo* erschweren. Hier werden Derivate der jeweiligen Substanz hergestellt, die meist eine geringe oder gar keine Wirksamkeit zeigen, gleichzeitig aber bessere pharmakologische Charakteristika besitzen als die ursprüngliche Substanz. Erst im Organismus findet die Umwandlung der „prodrug“ in die aktive Substanz statt. Auch die

räumliche Beschränkung der Therapie kann erreicht werden, wenn der Umsatz der „prodrug“ zum Wirkstoff zellspezifisch nur im Zielgewebe stattfindet. Beispiele für „prodrugs“ sind neben Heroin und Codein zum Beispiel Valaciclovir und Famciclovir, die als „prodrug“ des antiviralen Therapeutikums Aciclovir eine bessere orale Verfügbarkeit liefern als der ursprüngliche Wirkstoff (Reusser, 2000).

Generell besteht die Herausforderung der modernen Therapeutikaentwicklung nicht unbedingt in der Isolierung von *in vitro* aktiven Substanzen, da hierfür eine Vielzahl an modernen Methoden und Technologien zur Verfügung steht (siehe Abschnitt 2.3). Eine weitaus größere Schwierigkeit besteht darin, Substanzen zu generieren, deren chemische und pharmakologische Eigenschaften den Anforderungen an ein therapeutisch einsetzbares Medikament entsprechen.

2.2 Generelle Eigenschaften von Leitsubstanzen

Nicht alle biologisch aktiven Substanzen besitzen die für den Einsatz als Medikament erforderlichen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften. Zum Beispiel kann eine zu hohe Lipophilie die orale Absorption verhindern, während polare Moleküle keine membrangängigkeit z.B. bei der gastrointestinalen Aufnahme aufweisen. Die Halbwertszeit der Substanz bzw. deren funktionellen Gruppen kann z. B. beim Eintritt in die Leber durch Stoffwechselvorgänge vermindert werden. Zudem stellt die Toxizität der getesteten Substanzen den Hauptgrund für den frühzeitigen Abbruch von klinischen Studien dar (Lipinski und Hopkins, 2004).

Es zeigt sich, dass sich die Ansprüche an die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von Therapeutikakandidaten in den letzten Jahren trotz des technologischen Fortschritts, der zur Erschließung einer großen Bandbreite von neuen Zielstrukturen führte, kaum veränderten (Vieth *et al.*, 2004). Die Analyse der Charakteristika, die einer Substanz die Applikation *in vivo* erlauben, führte zur Definition der sogenannten „drug-likeness“ (Walters *et al.*, 2003). Insbesondere in den von Lipinski *et al.* aufgestellten Regeln zur Bestimmung der „drug-likeness“, die sogenannten „Lipinski’s rule of five“ (Lipinski *et al.*, 2001), sind Richtlinien zur Analyse von pharmakologisch interessanten Substanzen gegeben.

Lipinskis Analysen zeigten, dass historisch gesehen 90 % aller oral verabreichten Wirkstoffe die folgenden Charakteristika aufwiesen.

Sie besitzen:

- weniger als fünf Wasserstoffbrücken-Donatoren
- weniger als zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren
- eine molekulare Masse von < 500 Da
- eine Lipophilie von $\text{LogP} < 5$

Anhand dieser Regeln kann erwartet werden, dass Substanzen, die weniger als drei dieser Kriterien erfüllen, eine ungenügende Aufnahmerate aufweisen und somit als oral verabreichbare Medikamente nicht in Frage kommen. Tatsächlich konnten 40 % aller fehlgeschlagenen klinischen Studien auf die ungenügende orale Verfügbarkeit der getesteten Substanz zurückgeführt werden (Prentis *et al.*, 1988, Walters, 1999)

Die pharmakokinetischen Eigenschaften, die den erfolgreichen Einsatz einer Leitstruktur erlauben, sind jedoch nicht auf die orale Verfügbarkeit beschränkt. Vielmehr konnte den Charakteristika bezüglich Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion (ADME) eine Schlüsselrolle zugewiesen werden. Aus diesem Grund werden heute zusätzlich zu den Studien zur pharmakologischen Aktivität im Verlauf der Leitstruktur-Optimierung Untersuchungen bezüglich der pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz durchgeführt. Um Zeit, Kosten und Arbeit zu sparen soll dies in möglichst frühen Stadien die pharmakokinetisch ungeeigneten Substanzen aus den weiteren Optimierungsstudien ausschließen, (Thompson, 2000; Eddershaw *et al.*, 2000, Li, 2001; Lin *et al.*, 2003).

Betrachtet man die Gesamtheit aller möglichen chemischen Substanzen, den sogenannten „chemical space“ (Abbildung 1), so scheinen pharmakologisch aktive und applizierbare Substanzen nicht zufällig über alle vorstellbaren Substanzgruppen verteilt zu sein. Vielmehr existieren innerhalb des chemischen Kontinuums diskrete bioaktive Regionen, die Substanzen enthalten, welche Affinitäten für biologische Makromoleküle aufweisen (Lipinski und Hopkins, 2004). Die Herausforderung in der Entwicklung von Therapeutika liegt nun darin, aus der theoretisch unendlichen Fülle von chemischen Substanzklassen diejenigen zu selektionieren und zu isolieren, die einen Effekt auf das gewählte Zielmolekül ausüben.

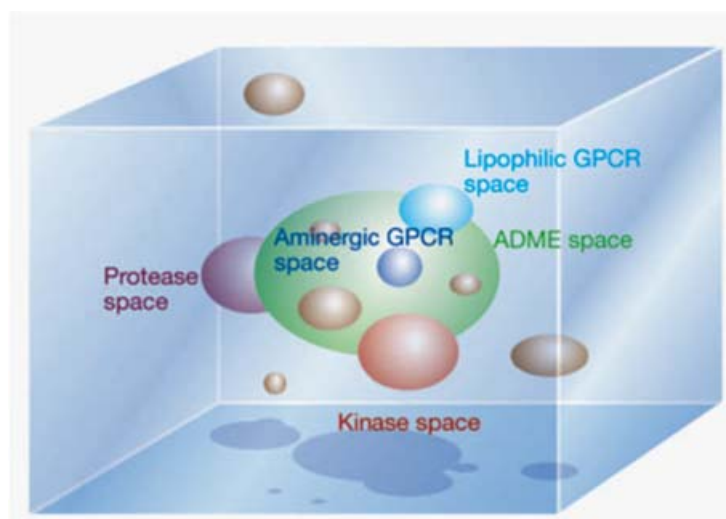


Abbildung 1: „chemical space“. Innerhalb der Gesamtheit aller chemischen Substanzen (hellblauer Kasten) findet man diskrete Areale von biologisch aktiven Substanzen (farbige ovale). Moleküle, die ähnliche Aktivitäten aufweisen oder ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften besitzen, sind nicht zufällig im Kontinuum des „chemical space“ verteilt, sondern können anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften gruppiert werden. Farbige Ovale stellen ausgewählte Substanzgruppen mit den angezeigten Funktionalitäten dar. GPCR: G-Protein gekoppelte Rezeptoren; ADME: Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion. (Abbildung entnommen aus Lipinski und Hopkins, 2004).

2.3 Isolierung von Leitsubstanzen

Die Basis für die Isolierung von pharmakologisch aktiven Substanzen ist typischerweise eine biologische Analysemethode, die es erlaubt, wirksame Substanzen von unwirksamen zu unterscheiden. In den Anfängen der Pharmakologie bestanden diese Analysemethoden meist in der Detektion von antibakterieller oder anti-inflammatorischer Aktivität, wobei diese meist *in vivo* durchgeführt wurden. Der Fortschritt in der Molekularbiologie erlaubt es jedoch heute, Tests *in vitro* mit isolierten Zielmolekülen und sensitiven Nachweismethoden wie z.B. fluoreszenzbasierten Systemen durchzuführen. Auch die Herkunft der zu testenden Substanzen veränderte sich im Laufe der Geschichte. Während es sich in der Vergangenheit bei diesen meist um Naturstoffe handelte, wird heute zusätzlich eine große Anzahl von synthetischen Molekülen analysiert (Bleicher *et al.*, 2003).

Die Synthese von neuen, artifiziellen Substanzen, sowie die Derivatisierung von bereits bekannten Stoffen für pharmakologische Zwecke ist das Ziel der kombinatorischen Chemie (Gordon *et al.*, 1994; Balkenhohl *et al.*, 1996). Seitdem 1992 zum ersten Mal die Synthese einer kombinatorischen chemischen Bibliothek publiziert wurde (Bunin und Ellman, 1992) stieg die Anzahl der kombinatorisch erzeugten Substanzen rapide an. In Kombination mit der Entwicklung von Methoden, die sich zur raschen Analyse im Hochdurchsatz-Maßstab eignen, dem

sogenannten „high throughput screening“ (HTS), wurde die Suche und Isolierung von Leitsubstanzen revolutioniert. Es zeigte sich jedoch bei den frühen HTS-Analysen, dass die isolierten Strukturen nur unzureichend für den pharmazeutischen Einsatz geeignet waren. Dieses Problem war weniger im Auswahlmodus, d.h. im biologischen Analysesystem zu finden, sondern mehr in der Zusammensetzung der Bibliotheken. Es wurde mit Bibliotheken gearbeitet, die aus Naturstoffen sowie auch aus Syntheseprodukten zusammengestellt wurden, ohne die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Substanzen (siehe Abschnitt 2.2) zu beachten. Auch wurde schnell ersichtlich, dass die Anzahl positiv getesteter Substanzen mit der Komplexität der getesteten Substanzen abnahm (Hann *et al.*, 2001). Zudem lieferte die HTS-Technik trotz des höheren Probendurchsatzes und der höheren Strukturvariabilität der getesteten Substanzen generell weniger Leitsubstanzen als traditionelle pharmazeutische Wege der Medikamentenentwicklung. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren die Strategie der kombinatorischen Chemie hin zum rationalen Design von kleinen, sogenannten fokussierten Bibliotheken verschoben (Lewis, 1999). Diese Substanzgruppen sind weniger auf eine hohe strukturelle Variabilität ausgerichtet, vielmehr sollten sie aufgrund gezielt ausgewählter struktureller Eigenschaften Liganden für ein oder einige wenige Zielmoleküle darstellen.

Das Design einer fokussierten Bibliothek setzt voraus, dass bereits Einblicke in Struktur und Funktion des Zielmoleküls bzw. dessen Interaktion mit natürlichen Liganden gegeben sind. Eine Methode um geeignete Kandidaten für fokussierte Bibliotheken auszuwählen, ist die computergestützte virtuelle Analyse von potentiellen Interaktionspartnern. Diese setzt detaillierte Kenntnisse der Struktur des Zielmoleküls voraus und ist methodisch nahe verwandt mit dem Ansatz des molekularen *in silico* „dockings“. Es existieren hierbei eine Reihe verschiedener Ansätze zur Selektion von geeigneten Liganden aus virtuellen chemischen Bibliotheken (Beavers, 2002). Hierbei steht insbesondere die Suche nach sogenannten Pharmacophor-Strukturen im Vordergrund.

Der Begriff des Pharmacophors wurde zuerst von Paul Ehrlich geprägt, als ein molekulares Gerüst, das die essentiellen Eigenschaften für die biologische Aktivität eines Wirkstoffs trägt (Ehrlich, 1909). Diese Definition wurde auf die dreidimensionale Anordnung von Wasserstoffbrückendonatoren und -akzeptoren, sowie lipophiler und aromatischer Gruppen erweitert (Güner, 2000). Anhand dieser räumlichen und chemischen Eigenschaften kann die Modellierung von Interaktionsflächen zwischen Zielprotein und potentielltem Liganden erfolgen.

Trotz des Fortschritts in der Strukturaufklärung und vor allem den computergestützten Analyseverfahren können Fälle auftreten, in denen keine strukturellen Informationen über das Zielmolekül vorhanden sind. Zudem liefert auch der Gebrauch von fokussierten Bibliotheken keine Garantie für die erfolgreiche Isolierung von Substanzen, welche den gewünschten Effekt auf die Zielstruktur

ausüben. In diesen Fällen können kombinatorische Bibliotheken mit Hilfe von evolutiven Eigenschaften an die Zielstruktur angepasst werden. Allerdings eignen sich nicht alle Substanzgruppen für diese Art der Selektion. Es werden hier ausschließlich Biopolymere wie Peptide und Nukleinsäuren eingesetzt (Osborne und Ellington, 1997).

2.4 Nukleinsäureaptamere als therapeutische Moleküle

Nicht immer handelt es sich bei Leitsubstanzen um kleine chemische Substanzen. Auch deutlich größere Moleküle wie Biopolymere können für therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Der Vorteil von Biopolymeren wie z.B. Peptiden oder Nukleinsäuren liegt zum einen in ihrer hohen strukturellen Variabilität, welche in vergleichbarer Weise von keiner anderen Substanzgruppe erreicht wird. Zum anderen können sie mit einfachen molekularbiologischen und biochemischen Methoden isoliert und amplifiziert werden, was einen repetitiven Isolierungsvorgang erlaubt. Durch das Anlegen eines Selektionsdrucks kann ein evolutiver Vorgang simuliert werden. Das Darwin'sche Prinzip von „Variation - Selektion - Amplifikation“ kann auf diese Weise die Isolierung von Molekülen ermöglichen, deren Eigenschaften dem Selektionsdruck genügen (Kauffman und Ellington, 1999).

Nukleinsäuren liefern vielversprechende strukturelle und biochemische Eigenschaften, die sich für den Ansatz der evolutiven Ligandenselektion eignen. DNA- und insbesondere RNA-Moleküle können in Abhängigkeit von Temperatur und Salzgehalt ihrer Umgebung komplexe dreidimensionale Strukturen ausbilden, was ihre spezifische Bindung an jegliche Form von Zielstrukturen ermöglicht (Abbildung 2).

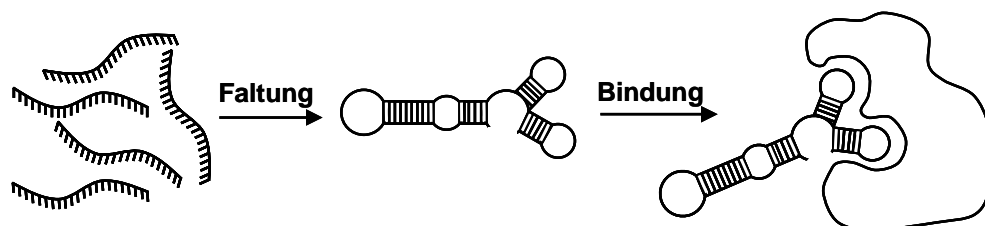


Abbildung 2: Nukleinsäuren als hochaffine Liganden. Voraussetzung für die Bindung ist die Faltung der Nukleinsäuren und die daraus resultierende dreidimensionale Struktur. Die komplexe strukturelle Organisation befähigt sie, hochaffin an Strukturen jeglicher Art zu binden.

RNA-Liganden können auf diese Weise Affinitäten zu ihrem Zielmolekül erreichen, die mit denen von Antikörpern vergleichbar oder sogar höher sind. Diese RNA-Liganden, die hochaffine Bindung an ihr Zielmolekül aufweisen, werden als Aptamere bezeichnet (lat. aptus: passend; Ellington und Szostak, 1990).

Üblicherweise liegen die Dissoziationskonstanten von RNA-Aptameren im unteren pikomolaren bis hin zum unteren nanomolaren Bereich, bei einer Spezifität, die z. B. die Diskriminierung zwischen enantiomeren Formen (Shoji *et al.*, J 2007) oder eng verwandten Proteinen (Wu *et al.*, 1992) erlaubt.

Ein Vorteil von RNA-Aptameren gegenüber Antikörpern liegt beispielsweise in ihrer Stabilität gegenüber denaturierenden Vorgängen. So werden Aptamere z. B. durch Hitze oder Salzeinwirkung nicht irreversibel geschädigt, sondern können renaturiert werden. Aptamere zeigten zudem in präklinischen Studien bisher auch bei sehr hohen Dosen keine oder nur sehr geringe Immunogenität (Nimjee *et al.*, 2005).

Die biologische Verfügbarkeit und die pharmakokinetischen Eigenschaften von Aptameren können auf vielfältige Art und Weise modifiziert werden. Beispielsweise kann die Stabilität gegenüber nukleolytischer Degradation durch den Einbau von 2'-modifizierten Nukleotiden erhöht werden. Durch Modifikationen der Enden wie z. B. das sogenannte „capping“ des 3'-Endes durch die 3'-3'-Verknüpfung mit einem Deoxythymidinnukleotid kann zusätzlich eine erhöhte Resistenz gegenüber Exonukleasen erreicht werden (Beigelmann *et al.*, 1995).

Ein weiterer Ansatz in der Entwicklung von nukleaseresistenten Aptameren ist die sogenannte Spiegelmer-Technologie (zusammengefasst in Eulberg und Klussmann, 2003). Hier werden RNA-Aptamere unter Verwendung von Nukleotiden in der natürlich vorkommenden D-Konformation generiert, die an das enantiomere Spiegelbild des gewünschten Zielmoleküls binden. Das korrespondierende L-Aptamer, das sogenannte Spiegelmer, bindet demzufolge an das natürlich vorkommende Enantiomer des Zielmoleküls und stellt aufgrund seiner stereochemischen Eigenschaften kein Ziel für die nukleolytische Degradation dar (Klussmann *et al.*, 1996; Nolte *et al.*, 1996).

Der größte Vorteil von Aptameren gegenüber Antikörpern liegt jedoch in ihrer Herstellung: Die Generierung von Aptameren kann *in vitro* erfolgen, wobei die Bedingungen gezielt moduliert werden können und erfordert nicht wie im Fall von Antikörpern ein lebendes biologisches System.

Basierend auf den biopolymeren Eigenschaften von Nukleinsäuren wurde im Jahre 1990 die SELEX-Technologie vorgestellt (Tuerk und Gold, 1990), wobei die Abkürzung SELEX für „Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment“ steht (Abbildung 3). Hierbei werden randomisierte Nukleinsäurebibliotheken generiert, im Fall von DNA-Molekülen durch chemische Synthese. Die Bibliotheken bestehen üblicherweise aus Molekülen, die einen 30 bis 50 Nukleotide umfassenden randomisierten Bereich besitzen. Dieser wird von konstanten Regionen flankiert, welche Bindestellen für „Primer“ darstellen und die Amplifizierung durch PCR ermöglichen. Im Fall von RNA-Bibliotheken tragen die konstanten Regionen der DNA-Moleküle zusätzlich eine Bindestelle für eine DNA-

abhängige RNA-Polymerase, was die Synthese einer korrespondierenden RNA-Bibliothek durch *in vitro* Transkription erlaubt. Diese Bibliotheken erreichen eine Komplexität von bis zu 10^{16} verschiedenen Molekülen (Osborne und Ellington, 1997), eine Anzahl, die von herkömmlichen chemischen Substanzbibliotheken nicht erreicht wird. Nach Anlegen eines Selektionsdrucks werden die Moleküle, welche die gewünschten Charakteristika aufweisen, separiert, revers transkribiert und amplifiziert. Auf diese Weise wird die Ausgangsbibliothek für den nächsten Selektionsschritt synthetisiert. Üblicherweise werden 6 bis 15 Zyklen dieser Art zur Generierung einer Molekülgruppe benötigt, welche die angestrebten Eigenschaften aufweist. Der Selektionsprozess wird an dieser Stelle beendet und die Bibliothek wird durch Klonierung vereinzelt. Daraufhin folgt die Sequenzierung und funktionelle Analyse der Einzelmoleküle.

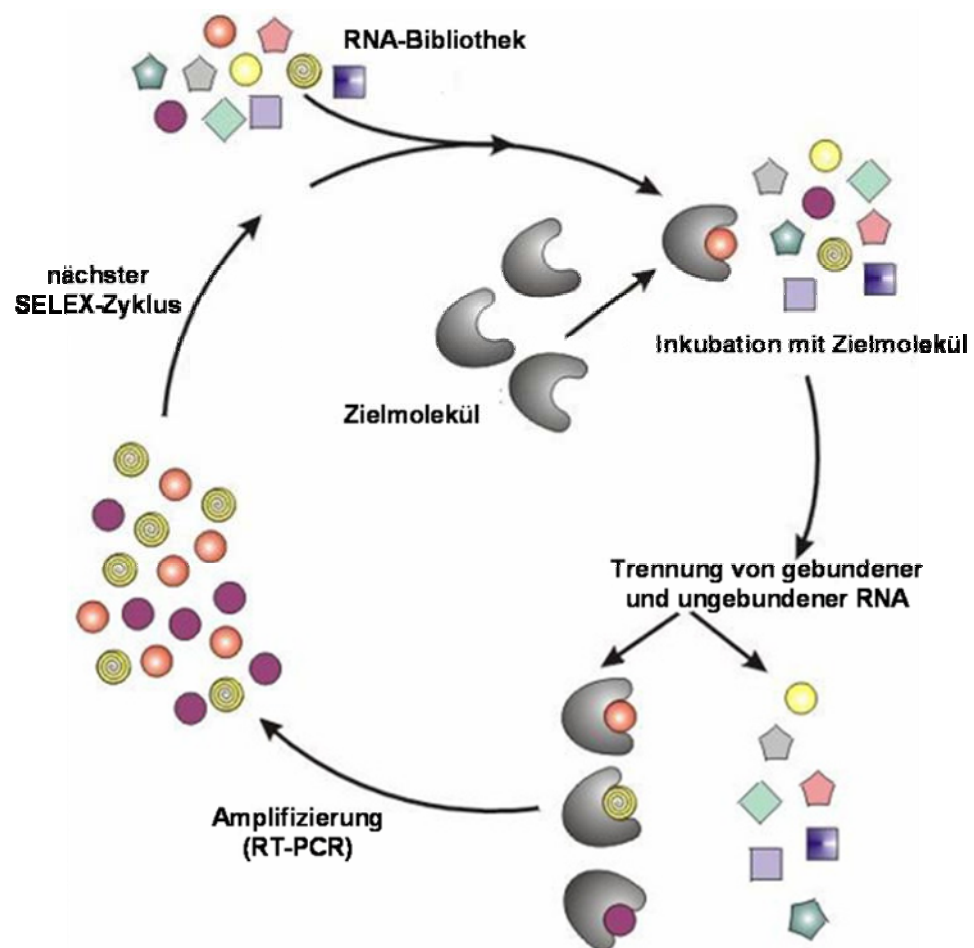


Abbildung 3: Die SELEX-Technologie. RNA-Aptamere können ausgehend von einer RNA-Bibliothek selektioniert werden. Nach Inkubation mit dem Zielmolekül werden gebundene von ungebundenen RNA-Molekülen separiert. Die gebundenen Moleküle werden revers transkribiert und amplifiziert. Auf diese Weise wird die Ausgangsbibliothek für den nächsten SELEX-Zyklus generiert. (Abbildung modifiziert nach White *et al.*, 2000)

Seit der Etablierung der SELEX-Technologie konnten eine Vielzahl von Nukleinsäure-Aptameren gegen die unterschiedlichsten Stoffklassen selektioniert werden, darunter Metallionen, Aminosäuren, Aminoglycoside, Peptide und (Membran)Proteine (zusammengefasst in: Hermann und Patel, 2000). Einen Überblick über die bislang selektionierten Aptamere kann mit Hilfe der Aptamer-Datenbank unter „<http://aptamer.icmb.utexas.edu>“ gewonnen werden.

Eine große Anzahl von Aptameren wurde zu therapeutischen Zwecken selektioniert (Nimjee *et al.*, 2005). Hierbei werden insbesondere akute Erkrankungen therapiert, bei denen ein spezifisches Zielmolekül existiert. Dieses soll durch die Bindung des Aptamers moduliert werden, was eine eindämmende Wirkung auf den Krankheitsverlauf ausüben soll.

Das prominenteste Beispiel für ein Aptamer-basiertes Therapeutikum ist das Präparat Macugen[®], das Ende 2004 als weltweit erstes Aptamer zur Zulassung gebracht wurde. Das Aptamer bindet an eine 165 Aminosäuren lange Isoform des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), einen Wachstumsfaktor, der in den Prozess der Angiogenese involviert ist. Die Angiogenese in ihrer krankhaft verstärkten Form spielt eine entscheidende Rolle z. B. bei Tumorerkrankungen, sowie unter anderem bei der altersbedingten Macular-Degeneration (AMD). Das Aptamer hemmt durch seine Bindung an VEGF in kompetitiver Weise dessen Interaktion mit seinem natürlichen Rezeptor, was die Angiogenese inhibiert und den Krankheitsverlauf stabilisiert (Ruckman *et al.*, 1998, Doggrell, 2005, Kourlas und Schiller, 2006).

Ein anderes Aptamer, das derzeit in klinischen Studien getestet wird, ist ein DNA-Aptamer, das Thrombin bindet und auf diese Weise die Blutgerinnung hemmt (Bock *et al.*, 1992). Zusätzlich wurden andere anti-koagulatorische Aptamere gegen die Blutgerinnungsfaktoren VIIa und IXa selektioniert (Rusconi *et al.*, 2000; Rusconi *et al.*, 2002). Es konnten Aptamere zur Neutralisierung von Antikörpern entwickelt werden, die an Autoimmunkrankheiten beteiligt sind (Lee und Sullenger, 1996; Lee und Sullenger, 1997). Desweiteren konnten anti-inflammatorische Aptamere im Kontext von Arthritis und Arteriosklerose generiert werden (Bless *et al.*, 1997, Jellinek *et al.*, 1995). Auch für die antivirale Therapie wurden bereits Aptamere selektioniert, die z. B. im Fall von HIV als Inhibitor der reversen Transkriptase die Replikation des Virus stören (Tuerk *et al.*, 1992) oder den Eintritt des Virus in die Wirtszelle hemmen (Khati *et al.*, 2003).

2.5 Nukleinsäureaptamere gegen Trypanosomeninfektionen

2.5.1 Parasitäre Erkrankungen – Die Afrikanische Schlafkrankheit

Parasitäre Infektionen gehören zu den Krankheiten, die zum Teil unkontrollierbare Ausmaße in einer Vielzahl von Ländern annehmen. Insbesondere Entwicklungsländer sind hierbei betroffen, in denen ein Großteil der Bevölkerung nur einen ungenügenden Zugang zu adäquater medizinischer Versorgung besitzt.

Bis zu 40 % der Weltbevölkerung leben in Malaria gefährdeten Gebieten (WHO: Malaria Fact sheet N°. 94, Mai 2007), wobei mehr als eine Million Menschen jährlich in Folge einer Infektion durch Plasmodien sterben. Geschätzte 12 Millionen Menschen leiden derzeit weltweit an einer Leishmaniose (WHO: Leishmaniasis - Magnitude of the Problem). In Zentral- und Südamerika wurden hingegen 16 – 18 Millionen Fälle der durch *Trypanosoma cruzi* ausgelösten Chagas' Krankheit, der Amerikanischen Trypanosomiasis berichtet (WHO: Report of the Scientific Working Group on Chagas' disease, 2005).

Die Afrikanische Trypanosomiasis hingegen wird durch Afrikanische Trypanosomen der Gattung *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) verursacht. Geschätzte 70 Millionen Menschen leben in den 36 bedrohten zentralafrikanischen Ländern, wobei 300 000 – 500 000 Infektionsfälle pro Jahr angenommen werden (WHO: African trypanosomiasis Fact sheet N°. 259, August 2006).

Afrikanische Trypanosomen sind einzellige, protozoische Parasiten, deren Lebenszyklus einen Wirtswechsel zwischen Tsetse-Fliege und Säugetier beinhaltet. *T. brucei brucei* löst die Tierseuche Nagana bei Pferden und anderem Nutztvieh aus, was die Tierhaltung in einem großen Bereich Zentralafrikas erheblich einschränkt. Bei *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense* handelt es sich um humanpathogene Stämme, die die Humane Afrikanische Trypanosomiasis (HAT) bzw. die sogenannte Afrikanische Schlafkrankheit beim Menschen verursachen. Das Vorkommen der beiden Stämme ist geographisch eingeschränkt und die Infektionen, die durch die jeweiligen Stämme ausgelöst werden unterscheiden sich anhand ihres Krankheitsbildes. Etwa 90 % aller humanen Trypanosomeninfektionen werden in West- und Zentralafrika durch *T. brucei gambiense* verursacht, was zur chronischen Form der HAT führt. Hingegen werden 10 % der Patienten mit einer akuten Variante der HAT durch den in Ost- und Südafrika vorkommenden Stamm *T. brucei rhodesiense* infiziert. Beide Infektionen führen trotz ihrer unterschiedlichen klinischen Ausprägung bei fehlender Behandlung zum Tod des Patienten.

Afrikanische Trypanosomen vermehren sich im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten ihres Säugetierwirtes. Die Oberfläche der Parasiten ist in

diesem Stadium mit einer dichten Hülle eines einzigen Oberflächenglykoproteins bedeckt, dem sogenannten „variable surface glycoprotein“ (VSG). Im Genom der Parasiten sind bis zu 1000 verschiedene VSG-Varianten codiert, zu einem gegebenen Zeitpunkt wird jedoch nur eine einzige dieser Varianten exprimiert. Die Exposition der VSG-bedeckten Oberfläche gegenüber dem Immunsystem des Wirtsorganismus führt zu einer starken Immunantwort. Zunächst kommt es zu einer T-Zellen-unabhängigen IgM-Antwort, auf die eine B-Zellen-Reaktion folgt, die in der Ausschüttung VSG-spezifischer IgG-Moleküle resultiert (Sternberg, 1998). Als Konsequenz dieser Immunantwort kommt es zur Eindämmung der Parasitämie. Es sind jedoch einige der Parasiten in der Lage, sich dem Zugriff des Immunsystems zu entziehen, indem sie die aktuell exprimierte VSG-Variante gegen eine andere austauschen. Dieser Mechanismus wird als „antigene Variation“ bezeichnet und beruht auf der Präsentation von immunologisch polymorphen N-terminalen Regionen gegenüber dem wirtseigenen Immunsystem (Pays *et al.*, 2004). Zusätzlich wirkt die VSG-Schicht als physikalische Barriere, da sie invariante Oberflächenproteine, die zwischen den VSG-Molekülen eingebettet vorliegen, sterisch gegen hochmolekulare Moleküle wie z.B. Antikörper abschirmt. Diese spezialisierte Oberfläche der Parasiten bereitet die Basis für eine chronische Infektion, die ohne adäquate Behandlung vom Körper des Patienten nicht eliminiert werden kann.

Eine Infektion durch Afrikanische Trypanosomen verläuft in zwei Stadien. Während des ersten Stadiums vermehren sich die Parasiten im Blut des Wirtes und verbreiten sich über die Lymphknoten in weitere Organe des Körpers wie Leber, Milz und Herz. Dieses Stadium geht mit eher undefinierten Symptomen einher, was die Diagnose insbesondere in sehr frühen Stadien erschwert. Mit dem Fortschreiten der Krankheit überqueren die Parasiten die Blut-Hirn-Schranke und vermehren sich im Zentralnervensystem. Dies äußert sich in schmerzhaften sensorischen sowie mentalen und neuronalen Störungen, die mit Angstzuständen und Reizbarkeit einhergehen. Es kommt zudem zu motorischer Beeinträchtigung sowie der namensgebenden Störung des Schlafverhaltens (Kennedy, 2006).

2.5.2 Diagnose und Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit

Für die erfolgreiche Therapie der HAT ist es notwendig, das Stadium der Krankheit zu diagnostizieren, da sich die Therapieformen für die beiden Krankheitsstadien erheblich unterscheiden. Im ersten Stadium der Krankheit erfolgt die Diagnose meist durch lichtmikroskopische Detektion der Parasiten im Blut des Patienten. Für Infektionen durch *T. brucei gambiense* existiert jedoch auch ein serologisches Schnelltestverfahren, der sogenannte „card agglutination trypanosome test“ (CATT) (Truc *et al.*, 2002). Die Diagnose des zweiten Stadiums hingegen erfordert die Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), wobei meist lichtmikroskopisch die Anwesenheit von Trypanosomenzellen

und/oder Leukozyten untersucht wird. Zudem lässt sich anhand der generellen Proteinkonzentration in der CSF sowie der Detektion von Antikörpern das Stadium der Krankheit feststellen (Chappuis *et al.*, 2005). Auch äußerst spezifische und sensitive PCR-basierte Diagnoseverfahren konnten entwickelt werden (Jamonneau *et al.*, 2003). Es existieren zudem massenspektrometrische Verfahren zum Nachweis von trypanosomalen Proteinen in den Körperflüssigkeiten des Wirtes (Papadopoulos *et al.*, 2004; Agranoff *et al.*, 2005). Solche hoch entwickelten Nachweismethoden sind jedoch in vielen bedrohten Gebieten aufgrund fehlender Infrastruktur nur in geringem Maße anwendbar, weshalb die Diagnose oft nur auf traditionellen lichtmikroskopischen Verfahren beruht. Hierbei hängt die Sensitivität und Spezifität der Diagnose in erster Linie von den oft nur unzureichend geschulten Fähigkeiten des diagnostizierenden Personals ab. Zusätzlich wird die lichtmikroskopische Detektion von starken Schwankungen der Parasitämie im Blut während des Krankheitsverlaufs erschwert, und auch im frühen zweiten Stadium der Krankheit liegt die Zelldichte in der CSF oft unter dem Detektionslimit (Dumas und Bisser, 1999). Deshalb wird derzeit ein großes Gewicht auf die Entwicklung von einfachen und präzisen Diagnoseverfahren gelegt, um eine frühzeitige und flächendeckende Therapie der Krankheit zu ermöglichen (WHO: Strategic Direction for African Trypanosomiasis Research, 2002).

Die Behandlung von HAT erfolgt überwiegend mit Medikamenten, die seit Jahrzehnten nicht weiterentwickelt wurden und neben oft unzureichender Wirksamkeit viele Nebenwirkungen und hohe Toxizität aufweisen (Legros *et al.*, 2002). Die Behandlung von frühen Stadien erfolgt durch Pentamidin und Suramin. Suramin ist ein polyanionisches Molekül, das sich strukturell vom Farbstoff Trypanblau ableitet und bereits seit 1920 zur Therapie von Trypanosomeninfektionen eingesetzt wird. Der genaue Mechanismus seiner zytotoxischen Wirkung auf Trypanosomen konnte bis heute nicht geklärt werden, es ist jedoch bekannt, dass Suramin einen inhibitorischen Einfluss auf eine Reihe von enzymatischen Vorgängen ausübt (Pepin und Milford, 1994; Wang, 1995). Pentamidin wird seit den Vierziger Jahren des letzten Jahrhunderts zur Behandlung von HAT eingesetzt. Auch hier ist die genaue Wirkungsweise unbekannt, es konnte allerdings gezeigt werden, dass Pentamidin mit hoher Affinität von der Trypanosomenzelle aufgenommen wird und bis hin zu millimolaren Konzentrationen im Zellinneren akkumuliert (Damper und Patton, 1976a,b; Berger *et al.*, 1995). Suramin und Pentamidin weisen beide eine hohe Wirksamkeit bei Patienten im frühen Stadium auf, sie sind jedoch für die Therapie des zweiten Stadiums nicht geeignet, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überschreiten können.

Im zweiten Stadium der Infektion werden die Blut-Hirn-Schranken gängigen Therapeutika Melarsoprol, Eflornithin und Nifurtimox verwendet. Bei Melarsoprol handelt es sich um eine organische Arsenverbindung, die seit 1947 für die

Behandlung von HAT eingesetzt wird. Der Mechanismus der zytotoxischen Aktivität von Melarsoprol gegenüber Trypanosomenzellen ist unklar, jedoch legt seine geringe Halbwertszeit im Blut nahe, dass es sich bei der wirksamen Komponente um ein Abbauprodukt des Melarsoprols handelt (Bronner *et al.*, 1998; Keiser *et al.*, 2000). Zudem konnten Resistenzen beobachtet werden, die mit einem Defekt in der Aufnahme von Melarsoprol-Derivaten einhergehen (Carter und Fairlamb, 1993). Neben der ausgeprägten Resistenzentwicklung der Trypanosomenzellen gegenüber Melarsoprol besteht ein weiterer Nachteil in den schweren Nebenwirkungen, die bei Gabe von Melarsoprol beobachtet werden können. Bis zu 5 % der behandelten Patienten sterben an durch Melarsoprol ausgelösten Schädigungen des Gehirns.

Eflornithin wurde als einziges der gebräuchlichen HAT-Therapeutika in den letzten 50 Jahren entwickelt. Es wird seit 1990 eingesetzt (Nightingale, 1991) nachdem seine zytotoxische Aktivität gegenüber *T. brucei gambiense in vitro*, im Tiermodell und am Menschen demonstriert wurde (Bacchi *et al.*, 1980; McCann *et al.*, 1981; van Nieuwenhove *et al.*, 1985; Pepin *et al.*, 1987; Doua *et al.*, 1987). Eflornithin inhibiert irreversibel die Ornithindecaboxylase (ODC), die den ersten Schritt der für *T. brucei* essentiellen Polyaminbiosynthese katalysiert (Li *et al.*, 1998). Allerdings variiert die Sensitivität der unterschiedlichen Trypanosomenstämme gegenüber Eflornithin, höchstwahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher Halbwertszeiten der ODC in den verschiedenen Stämmen. So können zwar Infektionen durch *T. brucei gambiense* durch die Gabe von Eflornithin geheilt werden, *T. brucei rhodesiense* zeigt hingegen eine geringere Sensitivität, weshalb die Melarsoprol-Therapie nicht in allen Fällen durch Eflornithin substituiert werden kann.

Nifurtimox ist ein kostengünstiges und oral applizierbares Präparat, das bereits in den Sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts erfolgreich zur Behandlung der Amerikanischen Trypanosomiasis, der Chagas' Krankheit, eingesetzt wurde. Es wurde gezeigt, dass HAT-Patienten, die auf eine Medikation mit Melarsoprol nicht ansprachen, durch Nifurtimox therapiert werden können (van Nieuwenhove und Declercq, 1989; van Nieuwenhove, 1992). Allerdings wurde Nifurtimox bisher nur bei Patienten getestet, die an einer Infektion durch *T. brucei gambiense* litten, vergleichbare Arbeiten mit Patienten, die durch *T. brucei rhodesiense* infiziert wurden fehlen bis heute (Delespau und Koning, 2007). Der Einsatz von Nifurtimox erfordert aus diesem Grund weitere klinische Studien und die systematische Analyse von Resistenzen und Nebenwirkungen.

Die unzureichenden Medikationsmöglichkeiten von Patienten, die unter fortgeschrittener HAT leiden, erfordern neue therapeutische Ansätze. Es werden derzeit neue Substanzen in klinischen Studien gegen HAT getestet, wobei insbesondere aromatische Diamidin-Verbindungen vielversprechende Kandidaten für neue, hochwirksame Therapeutika darstellen (Soeiro *et al.*, 2005). Jedoch können auch sensitive und spezifische Diagnosemethoden weiterhelfen, die

Krankheit frühzeitig und vor dem Eintritt in das zweite Stadium zu diagnostizieren, so dass die Infektion bereits im frühen Stadium therapiert werden kann. Hierfür können die seit 2005 veröffentlichten Genomdaten von *T. brucei* und verwandten Trypanosomatiden (Berriman *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005 a & b) Anhaltspunkte für molekulare Marker und geeignete Sequenzbereiche für spezifische Diagnoseverfahren liefern.

Ein anderer Ansatz in der Entwicklung von Therapeutika gegen HAT besteht darin, die körpereigene Immunantwort des Wirtes für die Eindämmung der Krankheit zu nutzen. Hier sollen Strategien zum Umgehen der antigenen Variation entwickelt und nutzbar gemacht werden.

2.5.3 RNA-Aptamere gegen trypanosomale Oberflächenproteine

Die VSG-Schicht der Afrikanischen Trypanosomen stellt eine natürliche Barriere dar, welche die Interaktion von hochmolekularen Substanzen mit invarianten Oberflächenproteinen verhindert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Moleküle mit einem Molekulargewicht von ≤ 30 kDa, wie z.B. die Protease Trypsin, die VSG-Schicht penetrieren können (Johnson und Cross, 1979). Da Aptamere üblicherweise eine Größe von deutlich unter 30 kDa besitzen, stellen sie eine Alternative zu Antikörper-basierten Ansätzen dar. Es konnten bereits mehrere hochaffin bindende Aptamere gegen invariante Oberflächenproteine der Parasiten selektioniert werden, und auch Aptamere gegen invariante Bereiche der VSG-Moleküle konnten generiert werden (Homann und Göringer 1999, Lorger *et al.*, 2003, Homann *et al.*, 2006, zusammengefasst in: Göringer *et al.*, 2003). Eines dieser Aptamere, das sogenannte Aptamer 2-16, wurde gegen invariante Oberflächenproteine auf der trypanosomalen Oberfläche selektioniert (Homann und Göringer, 1999). Es bindet mit einem K_d im unteren nanomolaren Bereich an die Zellen und diskriminiert dabei nicht zwischen verschiedenen Trypanosomenstämmen.

Mit Hilfe von experimentellen Strukturanalysen in Kombination mit Energie-Minimierungs-Algorithmen wurde ein Strukturmodell erstellt, das eine Haarnadelstruktur in Verbindung mit einer unvollständigen Pseudoknotenstruktur nahe legt (Homann & Göringer, 2001). Es konnte ein dreidimensionales Strukturmodell errechnet werden, welches das Aptamer als ein globuläres, „disk“-förmiges Molekül darstellt (Abbildung 4). Anhand dieses Modells kann jedoch keine Aussage über den Bindemodus des Aptamers getroffen werden, zu diesem Zweck müsste die Struktur des Aptamers in Kombination mit dessen Bindepartner analysiert werden.

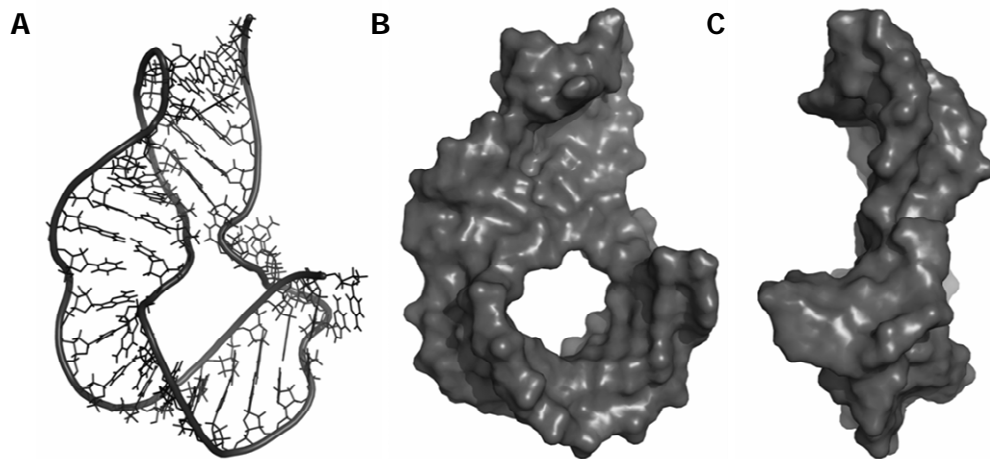


Abbildung 4: Das 3D-Strukturmodell von Aptamer 2-16. (A) Das dreidimensionale Strukturmodell des Aptamers zeigt eine Haarnadel, die mit einer Pseudoknotenstruktur kombiniert ist. Die Front- (B) und Seitenansicht (C) des Aptamers zeigt eine globuläre, scheibenförmige Struktur (Adler *et al.*, 2007, zur Veröffentlichung eingereicht) (Darstellung modifiziert mit PyMOL, DeLano Scientific).

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Aptamer-Präparationen konnte gezeigt werden, dass das Aptamer an die flagellare Tasche der Zelle bindet (Abbildung 5A). Die flagellare Tasche ist eine Invagination der Plasmamembran, die sich apikal nahe des Kinetoplasten der Zelle befindet. Sie ist die einzige Stelle an der Zelloberfläche, an der Endo- oder Exozytose stattfinden kann. Die Aufnahme von Nährstoffen und auch die Sortierung von Membranproteinen ist auf diese Region der Zellmembran beschränkt (Borst und Fairlamb 1998, Pays und Nolan, 1998, Landfear und Ignatushchenko, 2001, Overath und Engstler, 2004). Damit stellt sie eine funktionell hochspezialisierte Struktur der trypanosomalen Oberfläche dar und zeichnet sich durch eine hohe Dichte an invarianten Oberflächenproteinen aus. Auch diese sind aufgrund der speziellen Strukturierung der Membran im Bereich des Flagellums sterisch gegen den Angriff des Immunsystems abgeschirmt (Balber, 1990).

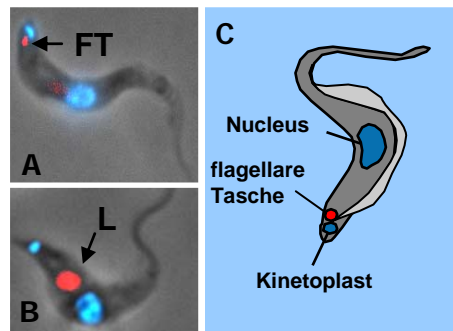


Abbildung 5: Zelluläre Lokalisierung von Aptamer 2-16. Lebende Trypanosomenzellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Präparationen von Aptamer 2-16 inkubiert. (A) Aptamer 2-16 bindet an die flagellare Tasche der Zelle. (B) Nach endozytischer Aufnahme reichert sich das Aptamer im Lysosom der Zelle an. (C) Lokalisation der flagellaren Tasche relativ zu Nukleus und Kinetoplast. fluoreszenzmarkierte RNA: rot; Nukleäre und Kinetoplasten-DNA wurde mit Hoechst 33342 gefärbt: blau. FT: flagellare Tasche; L: Lysosom. (Abbildung modifiziert nach Homann und Göringer, 1999 und 2001)

Es wurden bereits Versuche unternommen, das Zielprotein von Aptamer 2-16 auf der trypanosomalen Oberfläche zu charakterisieren und zu isolieren. Durch UV-Quervernetzungsexperimente konnte das Molekulargewicht des Bindepartners mit ca. 42 kDa ermittelt werden (Homann und Göringer, 1999). Die Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Aptamer-Präparationen zeigten zudem, dass Aptamer 2-16 nach der Bindung an die flagellare Tasche durch Endozytose aufgenommen wird und sich im Lysosom der Zelle anreichert (Abbildung 5B) (Homann und Göringer, 2001). Dasselbe Phänomen konnte auch mit kovalent durch Biotin modifizierten Varianten von Aptamer 2-16 beobachtet werden. Diese Beobachtung zeigt, dass Aptamer 2-16 dazu verwendet werden kann, kovalent verknüpfte Substanzen in einem „Huckepack-Mechanismus“ in das Lysosom der Trypanosomenzelle zu dirigieren. Dieser sogenannte „piggy back“-Ansatz bildet die Grundlage für die therapeutische Nutzung des Aptamers. Lysosomale Toxine können kovalent mit dem Aptamer verknüpft und durch die Bindung und Aufnahme des Aptamers in das Lysosom eingebracht werden, wo sie ihre zytotoxische Wirkung auf die Zelle ausüben können.

Auf diese Weise können dem Aptamer zusätzlich zu seinen Bindecharakteristika therapeutisch relevante Eigenschaften verliehen werden, die einen Effekt auf die Trypanosomenzelle erzielen.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Umwandlung von Aptamer 2-16 von einer *in vitro* bindenden Substanz hin zu einem therapeutisch nutzbaren Molekül. Es wurden zu diesem Zweck zwei Strategien verfolgt:

I. Der direkte Einsatz von Aptamer 2-16 als pharmakologisch aktive Substanz.

Hierfür mussten dem RNA-Molekül Eigenschaften verliehen werden, die dessen therapeutischen Einsatz im Körper des Patienten ermöglichen. Das Aptamer sollte derart modifiziert werden, dass es zusätzlich zu seinen Bindeeigenschaften Funktionen ausübt, die einen Effekt auf die Zielzelle zeigen.

Eine kritische Eigenschaft von pharmakologisch aktiven Substanzen ist ihre Stabilität in biologischen Flüssigkeiten wie z.B. Blut. Es muss gewährleistet sein, dass Aptamer 2-16 nicht von Serum-eigenen RNasen hydrolysiert oder über den Urinaltrakt ausgeschieden wird, bevor es zu einer Interaktion mit der Parasitenoberfläche kommt.

Es sollten deshalb zunächst Ribosemodifikationen dahingehend getestet werden inwiefern sie die Stabilität von Aptamer 2-16 im menschlichen Serum beeinflussen. Generell sollte im Weiteren die Verweildauer im menschlichen Körper durch Modifikation mit Polyethylenglycol erhöht werden. Letztendlich sollte der RNA durch Verknüpfung mit membranaktiven Substanzen eine zytotoxische Aktivität verliehen werden.

II. Der indirekte pharmazeutische Einsatz von Aptamer 2-16 zur Isolierung therapeutischer Leitsubstanzen.

Aptamere können genutzt werden, um Substanzbibliotheken nach Molekülen zu durchsuchen, welche dieselben Bindeeigenschaften wie das Aptamer aufweisen. Dies sollte mit Hilfe von Verdrängungsexperimenten durchgeführt werden, in denen die Bindung des Aptamers in Gegenwart von kompetierenden Substanzen analysiert wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Die Stabilität von Aptamer 2-16 in menschlichem Serum

3.1.1 Der Einfluss von Ribosemodifikationen auf die Serumstabilität von Aptamer 2-16

Zur Analyse der Stabilität von Aptamer 2-16 in menschlichem Serum wurden intern ^{32}P -markierte Aptamer Präparationen in Humanserum inkubiert und der Anteil der verbleibenden intakten RNA im Verlauf der Inkubationszeit bestimmt. Die Analyse der Zeitproben erfolgte nach Auftrennung in denaturierenden Polyacrylamidgelen durch quantitative Auswertung der Autoradiogramme. Wie vermutet unterliegt die 2-16 RNA einer rapiden Hydrolyse, wobei die Degradationskinetik angelehnt an eine exponentielle Abnahme erfolgt (Abbildung 6A). Eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von ≤ 5 s konnte bei 0°C bestimmt werden, während die Halbwertszeit bei 37°C ≤ 1 s angenommen wurde.

Die nukleolytische Degradation von RNAs kann durch Ribosemodifikationen vermindert werden, wobei üblicherweise die 2'-Hydroxylgruppe durch F- oder NH_2 -Gruppen substituiert wird (Eaton and Pieken, 1995) (Abbildung 6B). Aus diesem Grund wurde die 2-16 RNA durch die ko-transkriptionelle Inkorporierung von 2'-F- und/oder 2'- NH_2 -substituierten Pyrimidinnukleotiden modifiziert, wobei RNAs mit allen möglichen Kombinationen der vier substituierten Nukleotide generiert wurden. Im Fall der monosubstituierten Aptamer-Varianten resultierte dies in Modifikationsraten von 27 % (C) bzw. 21 % (U), die dual-(C/U)-modifizierten RNAs enthielten 48 % modifizierte Nukleotide. Die Serumstabilität der modifizierten Aptamer-Präparationen wurde analog zu der der unmodifizierten RNA bei 37°C bestimmt. In Abbildung 6C ist ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente dargestellt, das den exponentiellen Verlauf der zeitabhängigen Degradation der 2'-F-dC/dU-modifizierten 2-16 RNA zeigt.

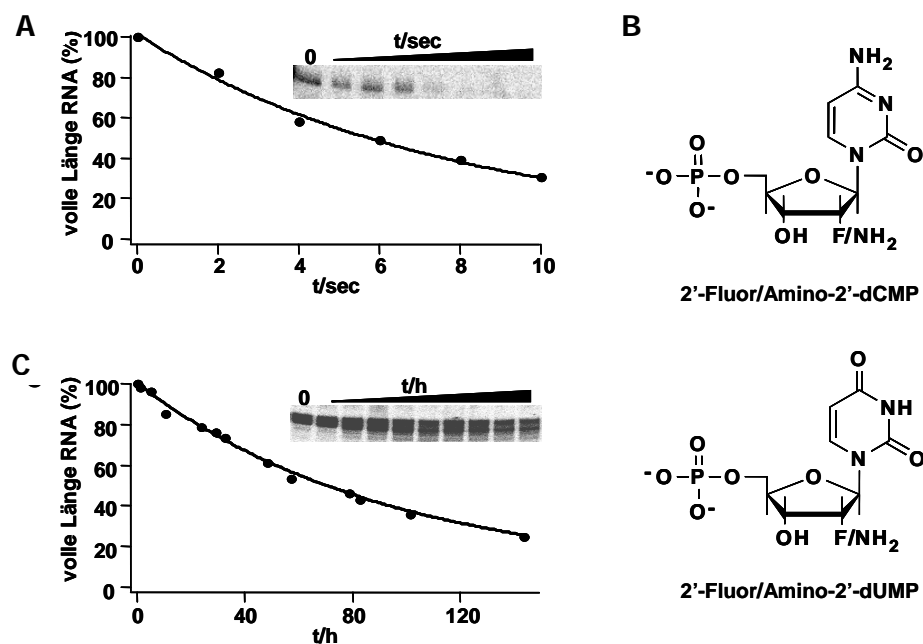


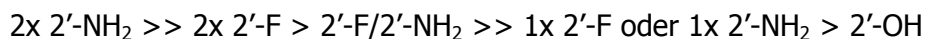
Abbildung 6: Die Stabilität von Aptamer 2-16 in Humanserum. Intern ³²P-markierte RNA wurde in Humanserum inkubiert und der Anteil an RNA mit voller Länge wurde in denaturierenden Polyacrylamidgelen analysiert (Insert). (A) Degradationskinetik der unmodifizierten 2-16 RNA in Humanserum über 10s bei 0°C. (B) Struktur von 2'-F und 2'-NH₂-dCMP/dUMP. (C) Degradationskinetik der 2'-F-dU/dC-modifizierten 2-16 RNA in Humanserum über 140 h bei 37°C. Die Datenpunkte wurden angelehnt an eine exponentielle Abnahme ausgeglichen.

Die ermittelten Halbwertszeiten für alle getesteten RNA-Populationen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Monosubstituierte Aptamer-Varianten zeigten eine um das 60-fache gesteigerte Stabilität, die Halbwertszeit wurde hierbei von ≤ 1 s auf ≤ 1 min erhöht. Zweifach modifizierte RNA-Präparationen unterschieden sich in ihren Halbwertszeiten in Abhängigkeit davon, welche Kombination von modifizierten Pyrimidinnukleotiden verwendet wurde. Die Verwendung je eines 2'-F- und eines 2'-NH₂-substituierten Pyrimidinnukleotids erhöhte die Halbwertszeit auf Werte von 1,5 Tagen, während die 2'-F-dC/dU-substituierte RNA einen $t_{1/2}$ -Wert von 3,4 Tagen aufwies (vgl. Abbildung 6C). Die höchste Stabilität konnte durch die Einführung beider 2'-NH₂-substituierter Pyrimidinnukleotide erreicht werden. Hier konnte eine Halbwertszeit von mehr als zwei Wochen extrapoliert werden.

Tabelle 1: Halbwertszeiten im Serum von unmodifizierter 2-16 RNA und 2'-substituierten Aptamer 2-16 Varianten. ¹Der Wert wurde anhand der vorhandenen Datenpunkte extrapoliert.

RNA Modifikation	Halbwertszeit ($t_{1/2}$)
unmodifiziert	≤ 1 s
2'-F-dCMP, 2'-F-dUMP	81 h
2'-NH ₂ -dCMP, 2'-NH ₂ -dUMP	367 h ¹
2'-F-dCMP, 2'-NH ₂ -dUMP	36 h
2'-NH ₂ -dCMP, 2'-F-dUMP	36 h
2'-F-dCMP	≤ 1 min
2'-F-dUMP	≤ 1 min
2'-NH ₂ -dCMP	≤ 1 min
2'-NH ₂ -dUMP	≤ 1 min

Zusammengefasst ergab sich die folgende Korrelation zwischen Modifikationsart und Stabilität:



Demnach hatte generell die vollständige Modifikation aller Pyrimidinnukleoside innerhalb des RNA-Moleküls einen größeren stabilisierenden Effekt als die Einführung von nur einem modifizierten Nukleotid. Zusätzlich zeigten RNA-Moleküle, die nur mit 2'-F- oder ausschließlich mit 2'-NH₂-substituierten Nukleotiden modifiziert wurden eine größere Stabilität als solche, bei denen Kombinationen aus beiden Modifikationsarten verwendet wurden. Letztendlich führte die Substitution beider Pyrimidinnukleotide durch 2'-NH₂-Gruppen zu der stabilsten RNA-Variante innerhalb der getesteten Population.

3.1.2 Der Einfluss von Ribosemodifikationen auf die Bindecharakteristika von Aptamer 2-16

3.1.2.1 Die Bindung von 2'-modifizierten RNA Varianten an lebende Trypanosomenzellen

Aptamer 2-16 wurde gegen invariante Strukturen an der Oberfläche der Blutstrom-Form afrikanischer Trypanosomen selektioniert und es konnte gezeigt werden, dass es mit einem K_d im unteren nanomolaren Bereich an ein Protein in der flagellaren Tasche bindet (Homann und Göringer, 1999). Da die Selektion in Gegenwart unmodifizierter Nukleotide erfolgte, musste im Folgenden untersucht werden, ob und wie die postselektionale Einführung von 2'-Modifikationen die Bindung des Aptamers beeinflusst.

Die in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen modifizierten Aptamer-Varianten wurden intern durch ^{32}P radioaktiv markiert und mit lebenden Blutstrom-Trypanosomen inkubiert. Der Anteil an gebundener RNA wurde in An- und Abwesenheit von einem mindestens 100-fachen molaren Überschuss an unmarkierter, unmodifizierter 2-16 RNA bestimmt. (Abbildung 7A). Die unmodifizierte 2-16 RNA wies bei diesen Experimenten eine durchschnittliche Zellbindung von ca. 10 % auf, dieser Anteil konnte durch Zugabe von homologer Kompetitor-RNA auf ca. 2 % verringert werden. Die Inkorporierung von ausschließlich 2'-NH₂-substituierten Nukleotiden führte, unabhängig davon ob mono- oder disubstituiert, zu einer deutlichen Verringerung der Bindeaktivität auf $\approx 2 - 4 \%$, dieser Anteil konnte durch Zugabe von in diesem Fall heterologer Kompetitor-RNA nur marginal verringert werden. Im Gegensatz hierzu wurde die Bindung durch das Einbringen von 2'-F-Modifikationen um bis zu 50 % erhöht, allerdings konnte insbesondere im Fall der 2'-F-dC/dU-substituierten RNA keine vollständige Kompetition erreicht werden. Aptamer-Varianten, die beide Modifikationsarten enthielten, zeigten kein einheitliches Bindeverhalten. Während die 2'-F-dC/2'-NH₂-dU modifizierte RNA einen leichten Rückgang der Bindung aufwies, war der Anteil an gebundener RNA im Fall der 2'-NH₂-dC/2'-F-dU-substituierten RNA im Vergleich zum unmodifizierten Aptamer im Schnitt um 80 % erhöht. Allerdings konnte keine der beiden gemischt-substituierten RNAs durch die Zugabe von unmodifizierter RNA vollständig verdrängt werden. So lag im Fall der 2'-NH₂-dC/2'-F-dU-substituierten RNA auch in Anwesenheit von einem Überschuss unmodifizierter 2-16 RNA der Anteil an gebundener RNA bei 11,5 % und damit noch über dem Anteil gebundener unmodifizierter RNA ohne Kompetition.

Es fiel auf, dass die Inkorporierung von 2'-F-substituierten Pyrimidinnukleotiden den Anteil an gebundener RNA in Zellbindungsexperimenten generell erhöhte. Da allerdings diese Bindung durch unmodifizierte 2-16 RNA nur teilweise kompetierbar war, könnte es sich hierbei um die Bindung an eine andere Bindestelle als die der unmodifizierten RNA oder um unspezifische Bindung

handeln. Falls die 2'-F-Modifikationen unspezifische Bindung an die trypanosomale Oberfläche fördern, so sollte dies ebenfalls bei RNA-Molekülen ohne spezifische Bindeaktivität zu beobachten sein.

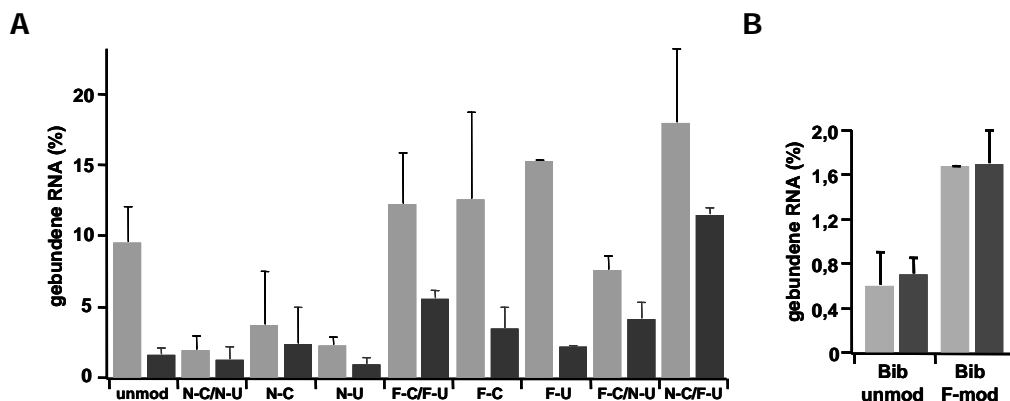


Abbildung 7: Zellbindung von modifizierten RNA Varianten. Intern ³²P-markierte unmodifizierte oder 2'-substituierte 2-16 RNA wurde mit lebenden Blutstrom-Trypanosomen inkubiert und der Anteil gebundener RNA bestimmt. (unmod: unmodifizierte RNA; N-C/N-U: 2'-NH₂-dC/dU-modifiziert; N-C: 2'-NH₂-dC-modifiziert; N-U: 2'-NH₂-dU-modifiziert; F-C/F-U: 2'-F-dC/dU-modifiziert; F-C: 2'-F-dC-modifiziert; F-U: 2'-F-dU-modifiziert; F-C/N-U: 2'-F-dC/2'-NH₂-dU-modifiziert; N-C/F-U: 2'-NH₂-dC/2'-F-dU-modifiziert) (B) Bindung einer unmodifizierten (unmod) oder einer 2'-F-dC/dU-modifizierten (F-mod), intern ³²P-markierten RNA-Bibliothek. Die Experimente erfolgten jeweils in Abwesenheit (hellgraue Balken) oder in Anwesenheit (dunkelgraue Balken) von einem mindestens 100-fachen Überschuss an unmarkierter, unmodifizierter 2-16 RNA. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Werte. (unmod: unmodifizierte RNA; N-C/N-U: 2'-NH₂-dC/dU-modifiziert; N-C: 2'-NH₂-dC-modifiziert; N-U: 2'-NH₂-dU-modifiziert; F-C/F-U: 2'-F-dC/dU-modifiziert; F-C: 2'-F-dC-modifiziert; F-U: 2'-F-dU-modifiziert; F-C/N-U: 2'-F-dC/2'-NH₂-dU-modifiziert; N-C/F-U: 2'-NH₂-dC/2'-F-dU-modifiziert)

Aus diesem Grund wurden Zellbindungsexperimente mit einer RNA-Bibliothek durchgeführt. Es handelte sich hierbei um Sequenzen, die eine zentrale Domäne bestehend aus 40 randomisierten Nukleotiden beinhalten. Diese Bibliothek war als Ausgangsbibliothek für das SELEX-Experiment benutzt worden, aus dem Aptamer 2-16 hervorgegangen war (Homann und Göringer, 1999) und sollte im unmodifizierten Zustand keine messbare spezifische Bindeaktivität besitzen. Tatsächlich zeigte die unmodifizierte RNA-Bibliothek nur eine schwache Hintergrundbindung von 0,7 % die durch Zugabe von 2-16 RNA als Kompetitor nicht signifikant kompetierbar war (Abbildung 7B). Die 2'-F-dC/dU-Substitution führte hingegen zu einer mehr als 2-fachen Erhöhung der Bindung in An- und Abwesenheit von 2-16 RNA (Abbildung 7B). Demnach führte die Inkorporierung von 2'-Fluor-modifizierten Pyrimidinnukleotiden zu einer generellen Erhöhung der unspezifischen Hintergrundbindung, womit die reduzierte Kompetierbarkeit der 2'-F-modifizierten 2-16 RNA-Varianten zumindest teilweise erklärt werden kann. Es kann an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die 2'-Modifikationen zur Erschließung einer oder mehrerer neuer Bindestellen an der

trypanosomalen Oberfläche führten, die keine Übereinstimmungen mit der Bindestelle des 2-16 Aptamers aufwiesen.

Betrachtet man diese Ergebnisse im Kontext mit dem vorangegangenen Abschnitt, so lässt sich feststellen, dass einzig die 2'-F-dC/dU-substituierte 2-16 RNA ein akzeptables Bindeverhalten in Kombination mit einer deutlich erhöhten Stabilität zeigt. Aus diesem Grund wurden die folgenden Experimente nur mit dieser RNA-Variante durchgeführt.

3.1.2.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante von 2'-F-dC/dU-substituierter 2-16 RNA

Die Bindung von unmodifizierter und 2'-F-dC/dU-substituierter 2-16 RNA wurde hinsichtlich ihrer Dissoziationskonstante (K_d) charakterisiert. Hierfür wurden lebende Trypanosomenzellen mit einer konstanten Menge der jeweiligen intern ^{32}P -markierten RNA-Präparation inkubiert, und die Bindung mit variierenden Konzentrationen der unmarkierten, unmodifizierten 2-16 RNA kompetiert. Dadurch wurde gewährleistet, dass einzig die Bindung an die spezifische Bindestelle des unmodifizierten Aptamers betrachtet wurde. Die so erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Scatchard-Auftragung analysiert (Scatchard, 1949), wobei die Dissoziationskonstante (K_d) anhand der Steigung des Graphen ($-1/K_d$) ermittelt wurde. Zusätzlich konnte die Anzahl der Bindestellen pro Zelle aus dem Schnittpunkt des Graphen mit der x-Achse bestimmt werden. Für beide RNA-Varianten sind repräsentative Scatchard-Auftragungen in Abbildung 8 dargestellt. Für die unmodifizierte 2-16 RNA wurde ein K_d von 10 nM und eine Anzahl an Bindestellen von $1\text{-}2 \cdot 10^4$ pro Zelle bestimmt.

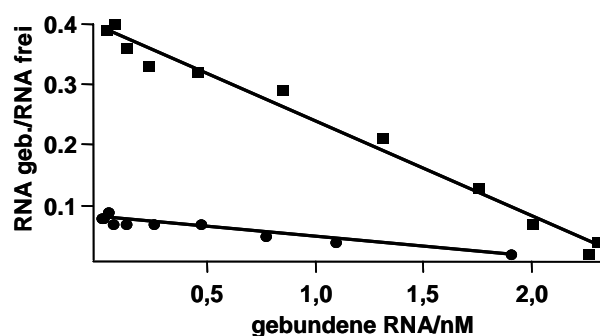


Abbildung 8: Bindecharakteristika von unmodifiziertem und 2'-F-dC/dU-substituiertem Aptamer 2-16. Scatchard-Auftragung der konzentrationsabhängigen Bindung von unmodifizierter (■) und 2'-F-dC/dU-modifizierter (●) 2-16 RNA an lebende Blutstrom-Trypanosomen. Anhand der Steigung der Ausgleichsgeraden konnte die Dissoziationskonstante ermittelt werden ($m = -1/K_d$), der Schnittpunkt mit der x-Achse repräsentierte die Anzahl der Bindestellen. $K_d(\text{unmodifiziert}) = 10 \text{ nM}$, $K_d(2'\text{-F-dC/dU-modifiziert}) = 45 \text{ nM}$.

Die Charakterisierung der Bindung im Fall der 2'-F-dC/dU-substituierten 2-16 RNA gestaltete sich etwas komplizierter aufgrund der unspezifischen Hintergrundbindung. Hier konnte der Anteil an gebundener RNA trotz Zugabe von hohen Konzentrationen von unmodifizierter 2-16 RNA nicht auf Werte unter 15 – 20 % gebundene RNA gesenkt werden. Dieser Anteil konnte jedoch durch die Zugabe von bis zu 300 nM 2'-F-dC/dU-modifizierte RNA-Bibliothek auf 12 – 13 % reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man diesen Wert mit der vollständigen Kompetition der unmodifizierten 2-16 RNA auf Werte um 2 %, so verbleibt im Fall der 2'-F-dC/dU-substituierten RNA ein Anteil von ca. 11 %, gebundener RNA, deren Bindung offensichtlich nicht demselben Bindemodus unterliegt wie die der unmodifizierte 2-16 RNA. Hier wurde vermutlich eine oder mehrere neue Bindestellen erschlossen, deren Bindung durch unmodifizierte 2-16 RNA nicht kompetiert werden konnte. Ziel war es hier, die Bindung der modifizierten 2-16 RNA an die „originale“ 2-16-Bindestelle zu charakterisieren, was vor einem Hintergrund von 11 % Hintergrundbindung nicht ohne Verfälschung der Berechnungen möglich ist. Aus diesem Grund wurde dieser Anteil von 11 % von allen Bindedaten subtrahiert und die korrigierten Werte ebenfalls einer Scatchard-Analyse unterzogen. Die daraus erhaltenen Daten zeigen eine Verringerung der Affinität um das 4,5-fache auf einen K_d von 45 nM sowie eine etwa vergleichbare Anzahl der Bindestellen von $\leq 10^4$ /Zelle.

3.1.2.3 Bindung und Aufnahme von 2'-F-dC/dU-modifizierter 2-16 RNA durch lebende Trypanosomenzellen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Aptamer 2-16 an ein Zielprotein innerhalb der flagellaren Tasche bindet, im weiteren Verlauf über den endozytotischen Apparat in das Zellinnere gelangt und letztendlich im Lysosom der Parasiten angereichert wird (Homann & Göringer, 1999; Homann & Göringer, 2001). Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob die 2'-F-dC/dU-substituierte 2-16 RNA ebenfalls diesem Bindungs- und Aufnahmeweg unterliegt.

Zu diesem Zweck wurde unmodifizierte und 2'-F-dC/dU-modifizierte 2-16 RNA durch den ko-transkriptionellen Einbau eines Biotin-modifizierten ATP-Analogons biotinyliert und die Bindung der RNA an lebende Trypanosomenzellen mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten α -Biotin-Antikörpers detektiert (Abbildung 9). Die Zellbindung wurde zunächst auf Eis durchgeführt, also bei Temperaturbedingungen unter denen keine Endo- oder Exozytose stattfindet (Abbildung 9A und 4C). Es zeigte sich sowohl im Fall der unmodifizierten als auch bei der 2'-F-modifizierten RNA ein charakteristisches, punktförmiges Fluoreszenzsignal innerhalb der flagellaren Tasche. Erlaubten die Bindungsbedingungen endozytotische Vorgänge, d.h. wurde die Bindung bei Raumtemperatur durchgeführt, so konnte die Aufnahme beider RNA-Varianten anhand des Fluoreszenzsignals in das Zellinnere verfolgt werden, das Signal

befand sich in beiden Fällen vollständig im Lysosom der Zellen lokalisiert (Abbildung 9B und 4D). Es konnten keine weiteren Bindestellen auf der Oberfläche der Zellen detektiert werden. Das 2'-F-dC/dU-modifizierte Aptamer bindet somit an die gleiche Stelle auf der trypanosomalen Oberfläche und wird über den gleichen endozytotischen Weg aufgenommen wie das unmodifizierte Aptamer.

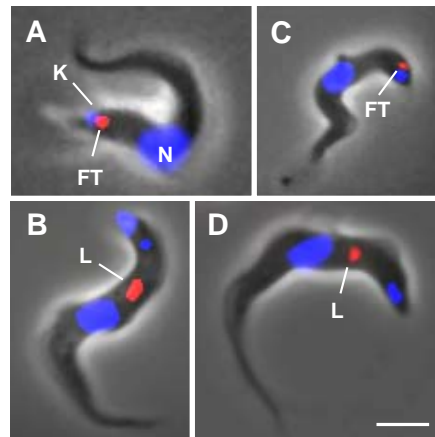


Abbildung 9: Zelluläre Lokalisierung von unmodifizierter und 2'-F-dC/dU-substituierter 2-16 RNA. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen-gebundener unmodifizierter (A/B) und 2'-F-dC/dU-modifizierter (C/D) 2-16 RNA. Lebende Blutstrom-Trypanosomen wurden mit biotinylierten Aptamer-Präparationen auf Eis (A/C) oder bei Raumtemperatur (B/D) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch einen Cy3-konjugierten α -Biotin-Antikörper (rot). Nukleäre und Kinetoplasten-DNA wurde mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). FT: flagellare Tasche; L: Lysosom; K: Kinetoplast; N: Nukleus. Skalierungsbalken: 5 μ m.

3.1.3 Strukturanalysen von 2'-modifizierter 2-16 RNA

3.1.3.1 Enzymatische und chemische Spaltungsexperimente

Die vorangegangenen Experimente zur Funktionalität der 2'-substituierten RNA-Präparationen zeigen, dass nur die 2'-F-dC/dU-modifizierte Variante des Aptamers 2-16 ähnliche Bindecharakteristika wie die des unmodifizierten Aptamers mit einer deutlichen Erhöhung der Serumstabilität kombiniert. Die Funktionalität einer RNA wird direkt von strukturellen Eigenschaften determiniert, Veränderungen in der strukturellen Organisation sollten demnach einen drastischen Einfluss auf die funktionellen Charakteristika ausüben.

Aptamer 2-16 weist eine hohe strukturelle Organisation auf. Durch experimentelle Strukturanalysen in Kombination mit Energie-Minimierungs-Algorithmen konnte ein Strukturmodell erstellt werden, das eine Haarnadel in Kombination mit einer unvollständigen Pseudoknotenstruktur nahe legt. (Homann und Göringer, 1999). Die Struktur einer RNA ist von elektrostatischen

Wechselwirkungen geprägt, in die das Vorhandensein einer 2'-Hydroxylgruppe wesentlich beiträgt. Aus diesem Grund wurde die modifizierte RNA-Variante hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften biochemisch und enzymatisch untersucht.

2'-F-dC/dU-substituierte RNA wurde einer Hydrolyse durch RNase T1 unterzogen, die hochspezifisch RNA-Moleküle auf der 3'-Seite von einzelsträngigen Guanosin-Resten schneidet und so unter limitierenden Bedingungen ein Sequenz- und Struktur-spezifisches Hydrolysemuster erzeugt. Zusätzlich wurden Experimente zur chemischen Hydrolyse der modifizierten RNA durchgeführt, das sogenannte „inline probing“. Hierbei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass RNA-Moleküle in Gegenwart bivalenter Kationen, meist Mg^{2+} , internen Transesterifizierungsreaktionen unterliegen (Soukup und Breaker, 1999; Winkler *et al.*, 2002). Die Geschwindigkeit dieser Reaktion hängt von der Konformation der die Spaltstelle umgebenden Nukleotide ab. Sie findet verstärkt in strukturell unorganisierten Regionen statt. Dort kann sich die Mg^{2+} -koordinierte „inline-Konformation“, die für die Transesterifizierungsreaktion notwendig ist, leichter ausbilden als in strukturell organisierten Bereichen der RNA. Hierbei ist zu beachten, dass im Fall der modifizierten RNA alle Pyrimidinnukleotide aufgrund ihrer 2'-Substitution gegenüber der chemischen Hydrolyse geschützt sind und aus diesem Grund Positionen, die von Purinnukleotiden besetzt sind bevorzugt gespalten werden.

In Abbildung 10 sind die auf diese Weisen erhaltenen Hydrolysemuster der 2'-F-dC/dU-substituierten 2-16 RNA im Vergleich zur unmodifizierten RNA abgebildet. Zusätzlich sind in Abbildung 11 die Daten, die anhand der enzymatischen und chemischen Strukturuntersuchungen gewonnen wurden zusammengefasst und in das bereits beschriebene Sekundärstrukturmodell des unmodifizierten Aptamers eingefügt (vgl. Homann und Göringer, 1999).

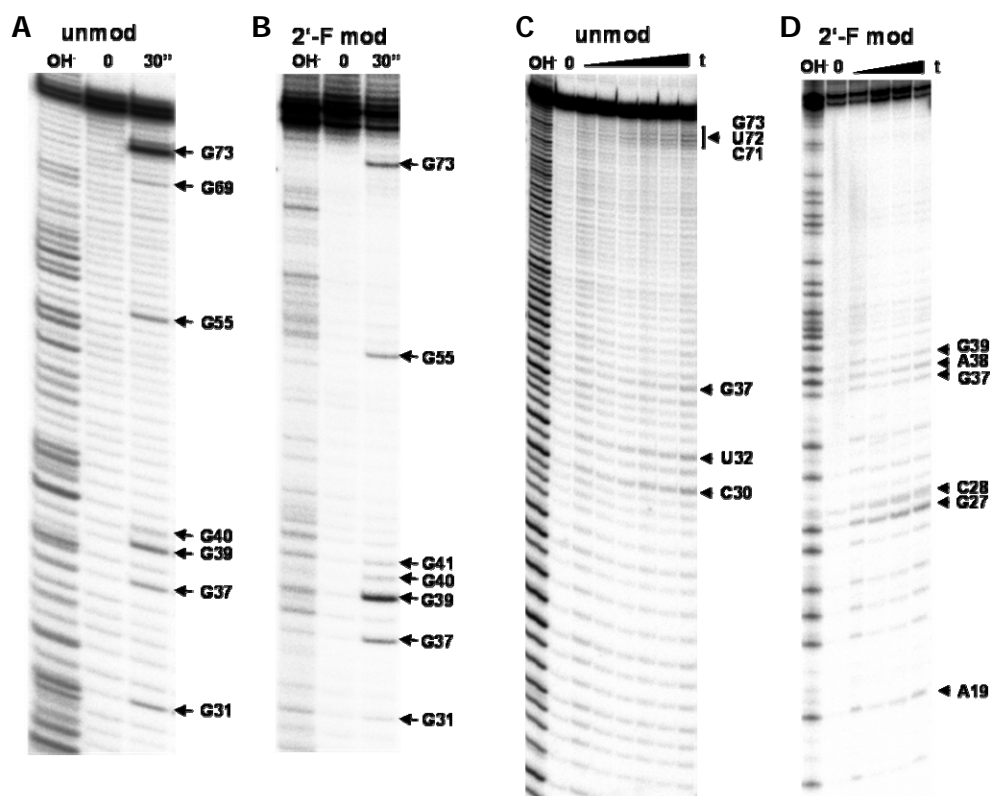


Abbildung 10: Chemische und enzymatische Hydrolyse von unmodifizierter und 2'-F-dC/dU-substituierter 2-16 RNA. Unmodifizierte (unmod) (A) und 2'-F-dC/dU-modifizierte (2'-F mod) (B) 2-16 RNA wurde unter limitierenden Enzymkonzentrationen durch RNase T1 hydrolysiert. „inline probing“ der unmodifizierter (C) und 2'-F-dC/dU-modifizierter (D) 2-16 RNA. Intern ^{32}P -markierte unmodifizierte und 2'-F-dC/dU-modifizierte 2-16 RNA wurde bis zu 48 h unter schwach alkalischen Bedingungen in Mg^{2+} -haltigem Puffer inkubiert. Die Hydrolyseprodukte wurden mit denaturierenden Polyacrylamidgelen analysiert. (unmod: unmodifizierte RNA; 2'-F mod: 2'-F-dC/dU-modifizierte RNA; OH: Alkalische Hydrolyseleiter der jeweiligen RNA-Variante. A, C, G, U mit Index: Nukleotidpositionen der 2-16 RNA, vgl. Abbildung 11)

Beide Methoden zeigten ein ähnliches Spaltungsmuster für modifizierte und unmodifizierte RNA, allerdings wurden einige lokale Differenzen sichtbar. Bei der Hydrolyse durch RNase T1 konnten im Fall der unmodifizierten RNA, wie bereits zuvor gezeigt, prominente Spaltstellen an den einzelsträngigen Positionen G31, G69 und G73 identifiziert werden (Homann und Göringer, 1999) (Abbildung 10A). Weitere weniger effiziente Spaltungsstellen fanden sich in der Pseudoknotenregion G37, G39 und G40 sowie G55 an der Basis von Helix 1. Diesen Positionen konnten zuvor anhand weiterer Experimente doppelsträngige Eigenschaften zugewiesen werden, die hier gezeigte Zugänglichkeit für eine einzelstrangspezifische Nuklease belegt die Dynamik der RNA-Struktur. Diese Dynamik erschien in der 2'-F-dC/dU-modifizierten RNA lokal erhöht (Abbildung 10B), da insbesondere die Pseudoknotenregion mit der verstärkten Spaltung bei G40 und G41 für einzelstrangspezifische Hydrolyse zugänglicher war als im Fall des unmodifizierten Aptamers. Im Gegensatz hierzu war G69 im Fall der

modifizierten RNA komplett gegen die enzymatische Spaltung geschützt. Dies deutet auf eine verstärkte Einbindung dieser Region in die strukturelle Organisation des modifizierten Aptamers hin.

Die Daten der „inline probing“-Experimente zeigten ein ähnliches Bild. Innerhalb der unmodifizierten 2-16 RNA war die Sensitivität gegenüber Mg^{2+} -katalysierter Hydrolyse besonders hoch in Bereichen, denen einzelsträngige Eigenschaften zugeschrieben wurden: Es wurden bevorzugt die unstrukturierten Regionen C71, U72 und G73 sowie C30, U32 und G37 gespalten (Abbildung 10C). Der erstgenannte Bereich von Position 71 bis 73 war im Fall der 2'-F-dC/dU-substituierten RNA gegen die chemische Hydrolyse geschützt (Abbildung 10D), obwohl dieser Bereich offensichtlich zugänglich für enzymatische Spaltung war (vgl. Abbildung 10B und Abbildung 11). Dasselbe galt für die Nukleotide an den Positionen 30 bis 32, wobei allerdings die Transesterifizierungsreaktion durch die 2-F-Substitution im Fall von C30 und U32 erschwert wurde. G31 war offensichtlich sowohl in der unmodifizierten als auch in der modifizierten RNA nicht zugänglich für die Mg^{2+} -katalysierte Spaltung, obwohl sich in beiden Fällen hier eine prominente RNase T1-Schnittstelle befand. Wie auch im Fall der unmodifizierten RNA war die Position G37 sensitiv gegenüber einem „inline“-Angriff, allerdings zeigte auch der innerhalb des Pseudoknotens liegende 3'-benachbarte Bereich mit G39 und A38 eine erhöhte Zugänglichkeit. Dies bestärkte die Theorie, dass die Struktur der 2'-F-dC/dU-modifizierten 2-16 RNA einer größeren dynamischen Variabilität unterlag als die unmodifizierte RNA.

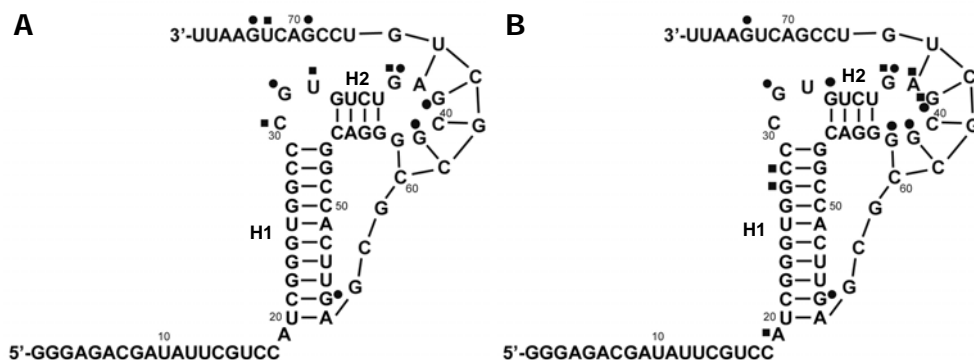


Abbildung 11: Zusammenfassung der Strukturdaten. Die anhand des RNase T1-Hydrolysemusters und des „inline-Probing“ gewonnenen Strukturinformationen sind in das Strukturmodell der unmodifizierten RNA eingefügt. (A) Die für enzymatische und chemische Spaltung zugänglichen Positionen der unmodifizierten RNA. (B) Die Schnittstellen der 2'-F-dC/dU-modifizierten 2-16 RNA. •: RNase T1-Schnittstelle; ■: Nukleotide, die in „inline probing“-Experimenten verstärkt zugänglich waren. H1/H2: vorhergesagte Helix 1 bzw. Helix 2 innerhalb des Strukturmodells der unmodifizierten 2-16 RNA.

3.1.3.2 Untersuchungen zur Thermostabilität von 2'-F-dU/dC-modifizierter 2-16 RNA

Die Thermostabilität von RNA-Molekülen kann durch die Einführung von modifizierten Nukleotiden beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass 2'-F-Substitutionen einen stabilisierenden Effekt auf DNA- und RNA-Moleküle ausüben, im Gegensatz zu 2'-NH₂-Modifikationen, die die Thermostabilität von Nukleinsäuren generell herabsetzen (Aurup *et al.*, 1994; Kawasaki *et al.*, 1993). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass unterschiedliche 2'-Substituenten aufgrund ihrer unterschiedlichen Elektronegativitäten die Ribosekonformation beeinflussen. Aus diesem Grund wurde die Thermostabilität der 2'-F-dC/dU-modifizierten 2-16 RNA im Vergleich zu der Stabilität des unmodifizierten Aptamers untersucht, wobei die Hyperchromizität der jeweiligen RNA-Präparation im Verlauf der Temperaturänderung gemessen wurde.

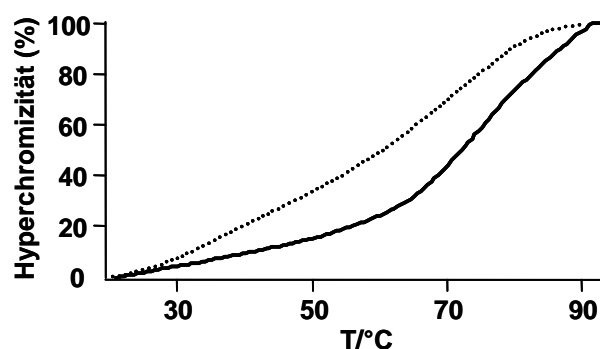


Abbildung 12: Thermostabilität der unmodifizierten und 2'-F-dC/dU-modifizierten 2-16 RNA. UV-Schmelzkurven von unmodifizierter (gepunktete Linie) und 2'-F-dC/dU-modifizierter (durchgezogene Linie) 2-16 RNA zwischen 20°C und 95°C.

In der Gegenwart von 100 mM monovalenten (Na⁺) und 0,5 mM divalenten (Mg²⁺) Kationen zeigte die unmodifizierte 2-16 RNA einen prominenten Übergang bei 58,3°C (Abbildung 12). Dieser Schmelzpunkt reflektierte höchstwahrscheinlich den Helix/Knäuel-Übergang von Helix 1 und Helix 2 innerhalb der Haarnadelstruktur (vgl. Abbildung 11). Die strukturelle Transition des Pseudoknotens konnte offenbar unter diesen Bedingungen nicht betrachtet werden. Im Fall der 2'-F-substituierten RNA konnte der Schmelzpunkt nur in Abwesenheit von mono- und divalenten Kationen bestimmt werden und lag bei 75,2°C (Abbildung 12), während in Anwesenheit von Salz keine Hyperchromizität messbar war. Aus dem daraus resultierenden ΔT_m von 16,9°C lies sich eine Zunahme von 0,5°C pro modifiziertes Nukleotid berechnen. Anhand der van't Hoff-Auftragung ermittelten Veränderungen von ΔH und ΔS kann eine Änderung der freien Energie $\Delta\Delta G$ von -25,7 kJ/mol ermittelt werden (Tabelle 2).

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass die 2'-F-Substitution aller Pyrimidinnukleotide innerhalb der 2-16 RNA die Strukturelemente der unmodifizierten RNA nicht wesentlich beeinflusste und zu einer erhöhten Thermostabilität führte.

Tabelle 2: Thermodynamische Parameter der unmodifizierten und 2'-F-dC/dU-modifizierten 2-16 RNA. Anhand der UV-Schmelzkurven von unmodifizierter und 2'-F-dC/dU-modifizierter 2-16 RNA wurden die thermodynamischen Parameter der RNA-Varianten anhand der van't Hoff-Auftragung ermittelt.

	2-16 unmod	2-16 2'-F-mod
T_m	58,3°C	75,2°C
ΔH	-66,4 kJ·mol ⁻¹	-219,2 kJ·mol ⁻¹
ΔS	-201,7 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹	-629,1 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
ΔG (25°C)	-6,3 kJ·mol ⁻¹	-31,6 kJ·mol ⁻¹

3.2 PEGylierung der 2-16 RNA

3.2.1 Kovalente Verknüpfung von Aptamer 2-16 mit Polyethylenglycol-Derivaten

Die Effektivität eines RNA Aptamers als therapeutisches Präparat hängt nicht nur von seiner Stabilität in menschlichen Körperflüssigkeiten ab, sondern generell von der Verweildauer der Substanz im biologischen System. In pharmakokinetischen Studien konnte gezeigt werden, dass intravenös applizierte Oligonukleotide und Aptamere sehr schnell über den Urinaltrakt ausgeschieden werden (Reyderman und Stavchansky, 1998; Watson *et al.*, 2000). Die Geschwindigkeit der renalen Ausscheidung hängt generell von der Größe des Moleküls ab (de Smidt *et al.*, 1991; Willis *et al.*, 1998; Tucker *et al.*, 1999). Daher kann die Verweildauer im Körper durch die Erhöhung der molekularen Masse gesteigert werden, wobei dies oft durch die kovalente Verknüpfung mit Polyethylenglycol (PEG)-Resten erreicht wird (Healy *et al.*, 2004).

Aus diesem Grund wurde Aptamer 2-16 am 5'-Ende über eine Phosphoamidat-Bindung mit PEG-Präparationen von unterschiedlichem Molekulargewicht verknüpft. Dies erfolgte mit Hilfe monofunktionaler NH_2 -derivatisierter Monomethoxy-PEG Derivate. Diese konnten im Fall der mPEG- NH_2 -Präparationen mit molekularen Massen von 10 und 20 kDa (mPEG₁₀₀₀₀- NH_2 , mPEG₂₀₀₀₀- NH_2) käuflich erworben werden. Im Fall des mPEG₅₀₀₀- NH_2 wurde die Addition einer NH_2 -Gruppe durch Oxidation der terminalen Hydroxylgruppe von mPEG₅₀₀₀ und reduktiver Aminierung der entstehenden Aldehyd-Funktion mit dem Diamin Spermin erreicht (Abbildung 13).

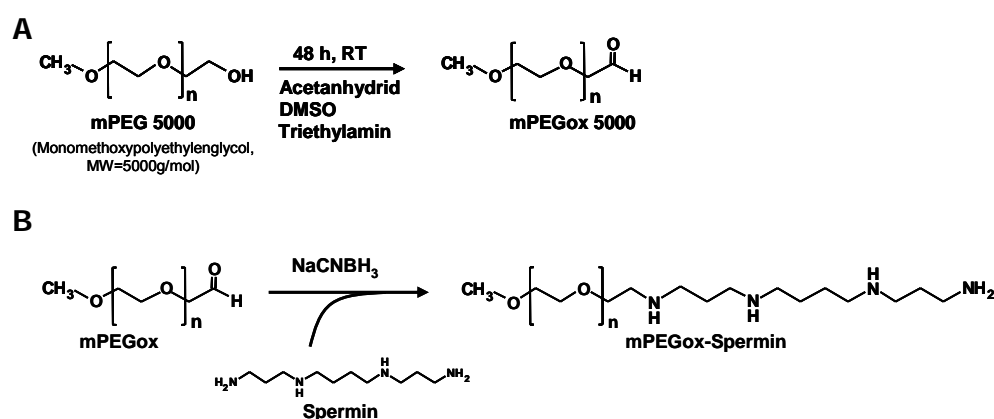


Abbildung 13: Modifikation von mPEG₅₀₀₀ zur Generierung einer terminalen Aminogruppe. mPEG₅₀₀₀ wurde nach der Moffat Reaktion oxidiert (A) und die dabei entstehende terminale Aldehydgruppe wurde mittels reduktiver Aminierung mit Spermin verknüpft (B).

Die kovalente Verknüpfung von RNA und mPEG-NH₂ erfolgte dann durch EDC-medierte Aktivierung des 5'-Phosphats in Gegenwart von Imidazol zum Phosphoimidazolid und nachfolgender Reaktion mit der durch mPEG-NH₂ bereitgestellten primären Aminogruppe (Abbildung 14). Die RNA wurde im Anschluss an die Reaktion durch Anionenaustauschchromatographie von nicht verknüpften mPEG-NH₂-Resten separiert und gelelektrophoretisch analysiert.

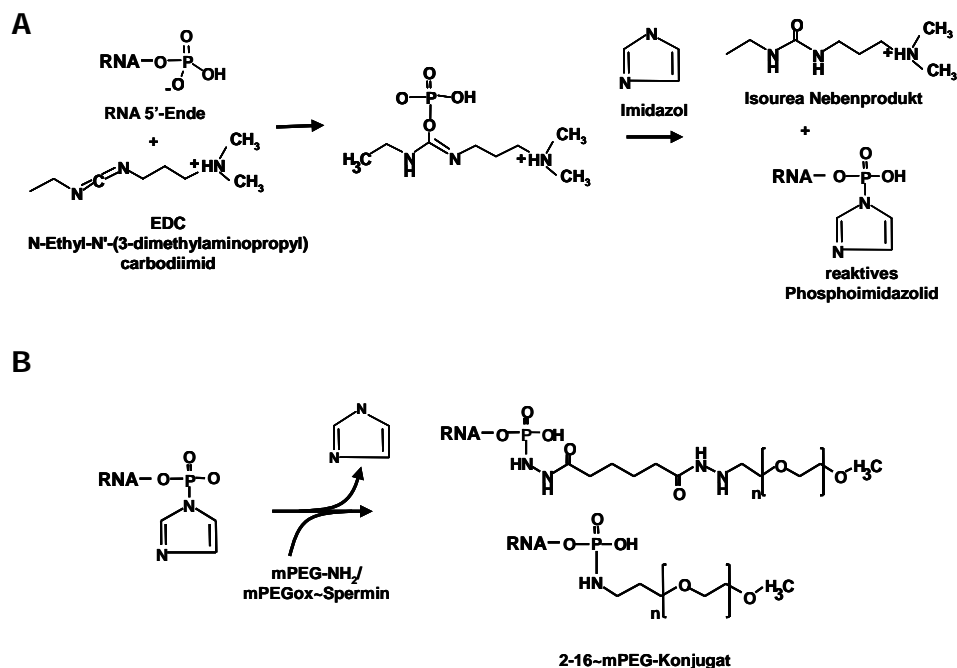


Abbildung 14: Kovalente Verknüpfung von NH₂-derivatisierten mPEG-Präparationen und Aptamer 2-16. (A) Die 2-16 RNA reagiert am 5'-Ende in einer EDC-medierten Reaktion mit Imidazol zum Phosphoimidazolid. (B) Die auf diese Weise aktivierte RNA kann mit den primären Aminogruppen der mPEG-NH₂-Derivate eine Phosphoamidatbindung ausbilden.

In Abbildung 15 sind die Gelanalysen von repräsentativen Verknüpfungsexperimenten dargestellt. In allen Fällen führte die kovalente Verknüpfung mit mPEG-NH₂-Präparationen zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität der RNA. Das Ausmaß dieser Änderung korrelierte jedoch nicht mit der Massenänderung, die durch die Modifikation mit PEG-Derivaten unterschiedlicher molekularer Masse hervorgerufen wurde. Eine Erklärung hierfür könnte in dem hier angewandten Nachweissystem liegen: Die Moleküle wurden durch eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert, wobei das Trennverhalten der Moleküle nicht zwangsläufig auf deren Molekulargewicht beruht, sondern auf der Kombination aus Ladung und hydrodynamischen Radius der Moleküle. Die Verknüpfung mit PEG führte zwar zu einer Erhöhung der molekularen Masse, jedoch veränderte sich die Ladung des Moleküls nicht, weshalb das Laufverhalten der PEGylierten RNA-Varianten nicht dem Laufverhalten von RNA-Molekülen vergleichbarer Größe entsprach. Deshalb

konnte anhand der elektrophoretischen Mobilität keine Aussage über die Größenveränderung der analysierten RNA-Präparationen getroffen werden.

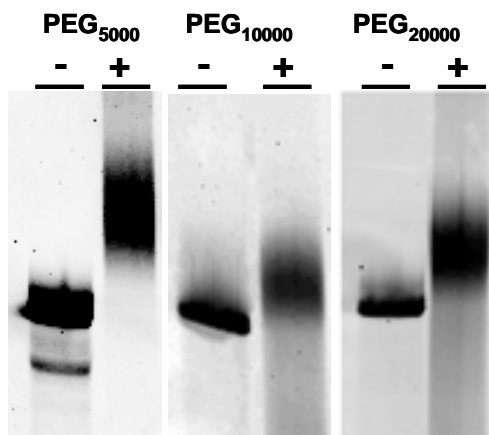


Abbildung 15: Modifikation von Aptamer 2-16 durch mPEG-NH₂-Derivate unterschiedlicher Größe. 2-16 RNA wurde am 5'-Ende durch mPEG-NH₂-Derivate mit molekularen Massen von 5, 10 und 20 kDa modifiziert. Die Modifikationsprodukte (+) wurden im Vergleich zur nicht-PEGylierten 2-16 RNA (-) anhand ihrer veränderten Mobilität in denaturierenden Polyacrylamidgelen analysiert.

Eine andere Beobachtung zeigte jedoch deutlich veränderte Eigenschaften der verknüpften RNA: Bei den zur Modifizierung verwendeten PEG-Derivaten handelte es sich nicht um Moleküle, die eine genau definierte Größe besitzen, d.h. die Moleküle innerhalb einer Präparation wurden nicht alle aus derselben Anzahl von Ethylenglycol-Monomeren generiert. Vielmehr liegen die PEG-Präparationen als polydisperse Mischungen vor, deren Größe sich an einer mittleren molekularen Masse orientiert. Die Polydispersität der PEG-Präparationen spiegelte sich im Laufverhalten der verknüpften RNA im denaturierenden Polyacrylamidgel wider, was eine Aussage über die Effizienz der Verknüpfungsreaktion erlaubte. Wie in Abbildung 15 beim Vergleich der Verknüpfungsprodukte (+) mit den jeweiligen RNAs vor der Reaktion (-) ersichtlich, zeigte sich im Fall der Verknüpfungsprodukte keine singuläre Bande, sondern eine polydisperse RNA-Population mit erhöhtem Molekulargewicht. Es war in allen Fällen keine unmodifizierte RNA detektierbar, die Modifikationseffizienz betrug demnach $\leq 100\%$.

3.2.2 Einfluss der PEG-Modifikationen auf das Bindeverhalten des Aptamers

3.2.2.1 Analyse der Bindeparameter der PEGylierten RNA-Varianten

Aptamer 2-16 konnte durch PEG-Derivate mit verschiedenen Molekulargewichten modifiziert werden. Auch hier ist es notwendig die biologische Aktivität der modifizierten Aptamer-Präparationen zu überprüfen. Aus diesem Grund wurden die Dissoziationskonstanten für die Bindung der PEGylierten Aptamer-Varianten an lebende Trypanosomenzellen ermittelt. Intern ^{32}P -markierte, PEGylierte RNA-Präparationen wurden mit lebenden Blutstrom-Trypanosomen inkubiert, und die Bindung wurde mit steigenden Mengen unmarkierter RNA homolog kompetiert. In Abbildung 16 sind repräsentative Scatchard-Analysen der Bindedaten dargestellt.

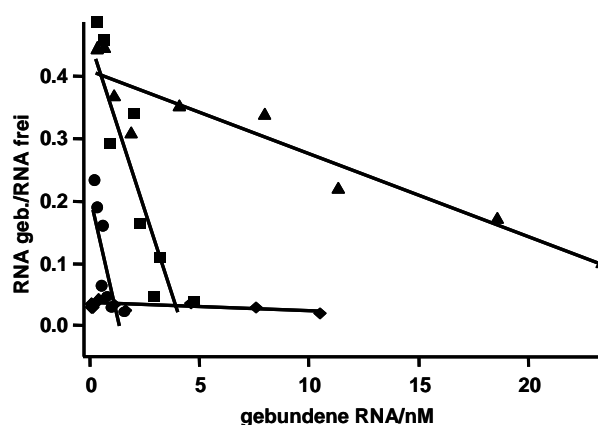


Abbildung 16: Bestimmung der Bindungscharakteristika der PEGylierten 2-16 RNA-Varianten. Die konzentrationsabhängige Bindung PEGylierter 2-16 RNA-Varianten wurde mit Hilfe der Scatchard Auftragung analysiert. ●: nicht PEGyliert; ■: mPEG₅₀₀₀; ◆: mPEG₁₀₀₀₀; ▲: mPEG₂₀₀₀₀. Anhand der Steigung der Ausgleichsgerade konnte die Dissoziationskonstante mit $m = -1/K_d$ ermittelt werden, die Anzahl der Bindestellen lieferte der Schnittpunkt mit der x-Achse. $K_d(\text{nicht PEGyliert}) = 10 \text{ nM}$; $K_d(\text{mPEG}_{5000}) = 10 \text{ nM}$; $K_d(\text{mPEG}_{10000}) = 75 \text{ nM}$; $K_d(\text{mPEG}_{20000}) = 750 \text{ nM}$.: RNase T1-Schnittstelle;

Es zeigte sich, dass die Bindung des mPEG₅₀₀₀~2-16-Konjugats im Vergleich zur unmodifizierten RNA durch die Modifikation nicht beeinflusst wurde und nach wie vor einen K_d von 10 nM aufwies. Die Modifikation der RNA durch mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ führte zu einem 7,5-fachen Rückgang der Affinität auf einen K_d von 75 nM. Die mPEG₂₀₀₀₀~2-16-Präparation zeigte eine noch schwächere Bindungsaffinität von 770 nM. Aus diesen Daten ging hervor, dass das Molekulargewicht des 2-16~PEG-Konjugats und dessen Bindeaffinität gegenüber lebenden Trypanosomenzellen invers korreliert sind. Die Addition von PEG-Molekülen mit molekularen Massen bis 10 kDa führte zu Konjugaten mit weiterhin akzeptabler

Bindeaktivität, während Konjugate mit höheren molekularen Massen signifikant schwächere Bindeaffinitäten aufwiesen und somit unbrauchbar waren.

Die Beeinflussung der Bindeaffinität könnte auf das Vorhandensein von nicht abgetrennten freien mPEG-NH₂-Resten zurückzuführen sein, die möglicherweise unspezifisch an die Oberfläche binden und das Aptamer aus seiner Bindestelle verdrängen. Aus diesem Grund wurde die Bindung der 2-16 RNA an lebende Trypanosomenzellen in Anwesenheit der verschiedenen mPEG-NH₂-Derivate durchgeführt. Es konnte in keinem Fall Konkurrenz beobachtet werden, was diese Möglichkeit der unspezifischen Verdrängung ausschloss (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.2 Bindung und Aufnahme von PEGylierter 2-16 RNA durch lebende Trypanosomenzellen

Im Fall des mPEG₁₀₀₀₀~2-16-Konjugats wurde die Bindung an Trypanosomenzellen visualisiert. Zu diesem Zweck wurde biotinylierte 2-16 RNA durch den ko-transkriptionellen Einbau eines Biotin-modifizierten UTP-Analogons hergestellt und durch mPEG₁₀₀₀₀ modifiziert. Das biotinylierte Konjugat wurde mit lebenden Blutstrom-Trypanosomen inkubiert und die gebundene RNA mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten α -Biotin-Antikörpers detektiert. Es zeigte sich hierbei das gleiche Bild wie im Fall der unmodifizierten RNA (vgl. Abbildung 9, Abschnitt 3.1.2.3). Wurde die Inkubation der Zellen auf Eis durchgeführt, also unter Bedingungen die keine endo- oder exozytotischen Vorgänge erlauben, so konnte die Bindung des Konjugats an die flagellare Tasche detektiert werden (Abbildung 17A). Bei höheren Temperaturen wurde das Konjugat wie auch die unmodifizierte RNA durch Endozytose aufgenommen und reichte sich im Lysosom der Zellen an (Abbildung 17B).

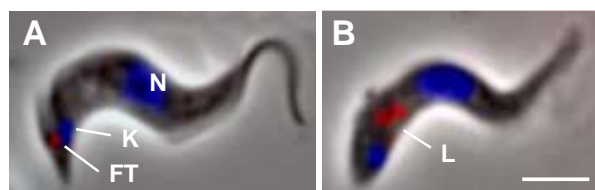


Abbildung 17: Zelluläre Lokalisierung von PEGylierter 2-16 RNA. Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung der Bindung und Aufnahme von Biotin-modifizierter, PEGylierter 2-16 RNA. Blutstrom-Trypanosomen wurden mit intern biotinyliertem, mPEG₁₀₀₀₀-modifiziertem Aptamer 2-16 inkubiert. Zell-gebundene RNA wurde mit Hilfe eines Cy3-konjugierten α -Biotin-Antikörper detektiert (rot). Nukleäre und Kinetoplasten-DNA wurde durch Hoechst-33342 gefärbt (blau). FT: flagellare Tasche; L: Lysosom; K: Kinetoplast; N: Nukleus. Skalierungsbalken: 5 μ m.

Das mPEG₁₀₀₀₀-modifizierte Aptamer 2-16 band demnach mit einer verschlechterten aber immer noch akzeptablen Affinität an die gleiche Bindestelle wie das unmodifizierte Aptamer. Zudem wurde es wie das unmodifizierte Aptamer ebenfalls über den endozytotischen Apparat in das Zellinnere transportiert.

3.3 Modifikation von Aptamer 2-16 mit membranaktiven Substanzen

T. brucei brucei ist im Gegensatz zu den humanpathogenen Stämmen *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense* nicht dazu in der Lage Menschen zu infizieren, da *T. brucei brucei* durch einen im menschlichen Serum befindlichen Faktor abgetötet wird. Es handelt sich um den sogenannten „Trypanosome Lytic Factor“ (TLF), der als Apolipoprotein L1 (ApoL1) näher beschrieben werden konnte (Vanhamme *et al.*, 2003). ApoL1 wird von Blutstrom-Trypanosomen durch Endozytose aufgenommen und reichert sich im Lysosom an. Dort kommt es zur Ausbildung von Poren in der lysosomalen Membran, was in einem osmotischen Wassereinstrom resultiert. Dies führt zu einer pathologischen Vergrößerung des Lysosoms und letztendlich zum Absterben der Zelle (Pérez-Morga *et al.*, 2005). Bei den humanpathogenen Stämmen *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense* hingegen existiert ein Resistenzmechanismus, der auf der Expression eines VSG-ähnlichen „serum resistance associated protein“ (SRA) beruht, das ApoL1 bindet und dessen Anreicherung im Lysosom verhindert (Oli *et al.*, 2006, Shiflett *et al.*, 2007). Eine Möglichkeit diesen Resistenzmechanismus zu umgehen liegt darin, die Interaktion von ApoL1 und dem SRA-Protein zu inhibieren (Baral *et al.*, 2006). Ein anderer Ansatz liegt darin, die grundsätzlichen Charakteristika der Lyse, d.h. die Aufnahme und Poren-bildenden Eigenschaften von ApoL1 durch artifizielle Moleküle zu imitieren, gegen die keine zelleigenen Abwehrmechanismen bestehen.

Mit Hilfe der SELEX Technologie konnte das sogenannte RNA-Aptamer 2-16 generiert werden, dass hochspezifisch mit einem K_d im unteren nanomolaren Bereich an eine invariante Struktur innerhalb der flagellaren Tasche von Blutstrom-Trypanosomen bindet (Homann und Göringer, 1999). Das Aptamer wird darauf folgend durch Endozytose aufgenommen und reichert sich im Lysosom der Parasiten an. Es konnte gezeigt werden, dass das Aptamer 2-16 dazu benutzt werden kann, eine kovalent verknüpfte Substanz auf „Huckepack-Art“ in das Lysosom zu dirigieren (Homann und Göringer, 2001). Ziel der folgenden Experimente war es, Substanzen auszuwählen und gegebenenfalls herzustellen, die Poren-bildende Aktivität besitzen, und diese kovalent mit Aptamer 2-16 zu verknüpfen. Das resultierende Konjugat sollte auf seine anti-trypanosomalen Eigenschaften getestet werden. Es wurden hydrophob-assoziierende Polymere, pH-steuerbare Pseudopeptide und membranaktive Peptide auf ihre Eignung in diesem Kontext untersucht.

3.3.1 Artificielle Polymere und Pseudopeptide – Poly (Lysin Dodecanamid) und Poly (Propylacrylsäure)

Die ideale anti-trypanosomale Therapie schließt Moleküle ein, die ihre zytotoxische Wirkung ausschließlich auf die zu eliminierende Zelle bzw. ausschließlich am gewünschten Wirkungsort ausbilden. Aus diesem Grund wurden Moleküle gewählt, die eine pH-abhängige Aktivität aufweisen. Diese Substanzen zeigen bei neutralen pH-Bedingungen keine zytotoxische Wirkung, sie liegen in einer elongierten Struktur vor. Wird der pH jedoch zu schwach sauren Bedingungen verschoben, wie sie in den endozytotischen Kompartimenten der Zelle vorherrschen, so findet eine strukturelle Transition statt. Ausgelöst wird der Konformationswechsel durch die Protonierung negativ geladener Seitenketten, wobei die Hydrophobizität des Moleküls erhöht und dicht gepackte „random coil“-Strukturen gefördert werden. Diese können mit Membranen interagieren und zur Porenbildung führen (Eccleston *et al.*, 2000; Tonge und Tighe, 2001).

Das hydrophob-assoziierende Polymer Poly(2-Propylacrylsäure) (Abbildung 18A) und das pH-steuerbare Pseudopeptid Poly(Lysin Dodecanamid) (Abbildung 18B) wurden in diesem Kontext untersucht. Beide Moleküle bestehen aus repetitiven Einheiten, wobei innerhalb der jeweiligen Einheit aliphatische Teile mit negativ geladenen Bereichen alternieren. Diese Zusammensetzung ist für die oben beschriebene pH-abhängige Strukturveränderung verantwortlich und bildet die Grundlage für die membrandisruptierende Aktivität dieser Substanzen.

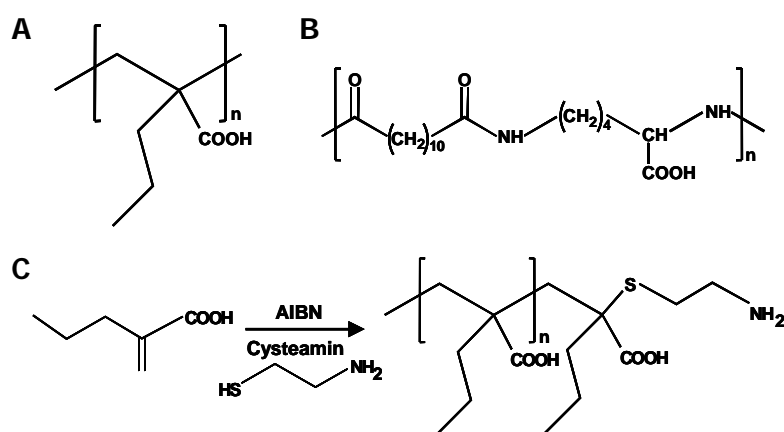


Abbildung 18: Polymere mit pH-abhängigen Eigenschaften. (A) Poly (2-Propylacrylsäure) und (B) Poly(Lysin Dodecanamid) bestehen aus alternierenden Einheiten von unpolaren und negativ geladenen Elementen, wodurch pH-abhängige Eigenschaften in Struktur und Aktivität generiert werden. (C) Es wurden NH₂-terminierte Poly(2-Propylacrylsäure)-Derivate erzeugt, indem die radikalische Polymerisation der 2-Propylacrylsäure-Monomere in Gegenwart von Cysteamin durchgeführt wurde (AIBN: Azobisisobutyronitril)

Poly(Lysin Dodecanamid) wurde durch Grenzflächenpolymerisation aus L-Lysin und Dodecandisäuredichlorid hergestellt (Eccleston *et al.*, 2000). Es zeigte sich jedoch, dass Poly(Lysin Dodecanamid) bei neutralen Bedingungen nur eine schwache Wasserlöslichkeit aufwies. Nur im stark basischen Milieu konnte das Polymer zumindest teilweise in wässrige Lösung gebracht werden, weshalb diese Substanz für weitere Experimente ungeeignet war.

Das Monomer 2-Propylacrylsäure wurde in einer mehrstufigen Synthese hergestellt und in einer radikalischen Polymerisation eingesetzt, die zur Bildung von Poly(2-Propylacrylsäure) (PPAS) führte (Ferrito und Tirrell, 1992; Murthy *et al.*, 1999). Die Polymerisationen wurden in Einzelfällen in Gegenwart von Cysteamin durchgeführt um Polymere zu erhalten, die eine terminale primäre Aminogruppe tragen (Abbildung 18C) (Lackney *et al.*, 2002). Diese sollte für die kovalente Verknüpfung mit der RNA genutzt werden. Poly(2-Propylacrylsäure) (PPAS) wies eine gute Löslichkeit unter neutralen wässrigen Bedingungen auf und konnte deshalb für weiterführende Experimente verwendet werden.

Es wurde zunächst die pH-abhängige membrandisruptierende Aktivität des Polymers überprüft, indem humane Erythrozyten bei pH-Werten zwischen 5 und 7,5 mit 100 µg/mL PPAS inkubiert wurden. Der Effizienz der Hämolyse wurde anhand des Austritts von Hämoglobin aus den Zellen photometrisch ermittelt. Es zeigte sich eine pH-abhängige Lyse der Erythrozyten (Abbildung 19). Während unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,5 weniger als 10 % der Zellen im Verlauf der Inkubation ihre Membranintegrität verloren, zeigte sich bei pH 6 eine maximale lytische Aktivität, bei der nur noch etwa 50 % der Zellen intakt waren. Die Tatsache, dass bei Werten unterhalb von pH 6 der Anteil unversehrter Zellen scheinbar wieder anstieg, ist weniger auf eine reduzierte Toxizität des Polymers zurückzuführen. Vielmehr kam es in diesen Proben zu verstärkter Präzipitation, die höchstwahrscheinlich auf die erhöhte Hydrophobizität des Polymers zurückzuführen ist. Es kann angenommen werden, dass im Zuge dieser Präzipitationseignisse auch Hämoglobin aus dem Ansatz ausgefällt wurde und so als Maß für die Integrität der Zellen in geringerem Maße detektierbar war. Es konnte jedoch an dieser Stelle festgestellt werden, dass die hier synthetisierte Poly(2-Propylacrylsäure) unter neutralen Bedingungen keinen signifikanten lytischen Effekt aufwies, während bei pH Werten von 6 und darunter die membrandisruptierende Aktivität des Polymers deutlich wurde.

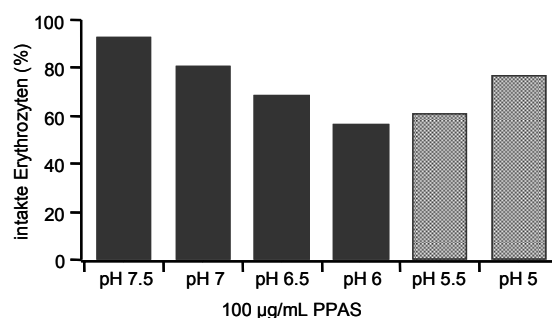


Abbildung 19: pH-abhängige Lyse von humanen Erythrozyten durch Poly (2-Propylacrylsäure). Humane Erythrozyten wurden unter verschiedenen pH-Bedingungen mit PPAS inkubiert. Der Anteil an lysierten Zellen wurde anhand des Austritts von Hämoglobin aus dem Zytosol in den umgebenden Puffer quantifiziert. Hierfür wurde die Absorption bei 541 nm der Ansätze vermessen.

Weiterhin wurde der Einfluss von PPAS auf Blutstrom-Trypanosomen analysiert. Es konnte zwar anhand der vorangegangenen Experimenten angenommen werden, dass die Inkubation von Trypanosomenzellen mit PPAS unter neutralen pH-Bedingungen keine Schäden durch Einwirkung des Polymers von außen auf die Zelle verursachen sollte. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass PPAS auch ohne zielführendes Aptamer in die Zelle aufgenommen wird und dort Schäden verursacht. Aus diesem Grund wurden Blutstrom-Trypanosomenzellen mit 10 – 300 µg/mL PPAS inkubiert und der Anteil überlebender Zellen durch eine fluoreszenzbasierte Methode bestimmt. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger toxischer Effekt auf die Zellen, wobei 50 % der Zellen bei einer Konzentration von 66,5 µg/mL abgetötet wurden (Abbildung 20). Unter der Annahme dass die Polymerisation Produkte im Bereich zwischen 18 und 60 kDa liefert (Murthy *et al.*, 1999, Lackney *et al.*, 2002), konnte demnach eine molare LD₅₀-Konzentration zwischen 1,1 und 3,7 µM, also im unteren mikromolaren Bereich berechnet werden. Die 100 % letale Dosis wurde im Bereich zwischen 3 und 11 µM angenommen.

Diese Konzentration spiegelt eine Reihe von Charakteristika der Interaktion zwischen Polymer und Trypanosomenzelle wider. Sie wird zum einen bestimmt durch die Bindungs- und Aufnahmerate des Polymers sowie von der aktiven Konzentration, die innerhalb der Zelle den zytotoxischen Effekt verursacht. Es kann erwartet werden, dass bei erfolgreicher Verknüpfung von Aptamer und Polymer aufgrund der hochaffinen Bindung und der effektiven Aufnahme der RNA der LD₅₀-Wert drastisch gesenkt werden kann, vorausgesetzt die Bindungscharakteristika des Aptamers werden durch die Modifikation nicht signifikant beeinträchtigt.

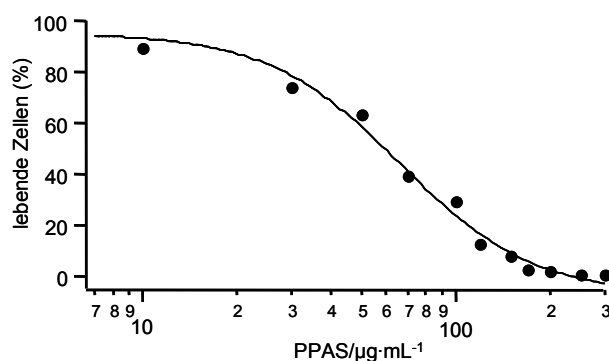


Abbildung 20: Zytotoxischer Effekt von Poly (2-Propylacrylsäure) auf Blutstrom-Trypanosomen. Blutstrom-Trypanosomen wurden unter neutralen pH-Bedingungen mit ansteigenden Konzentrationen an PPAS inkubiert. Der Anteil an lebenden Zellen wurde anhand des nur durch lebende Zellen erfolgenden Umsatzes von Calcein-AM zum fluoreszierenden Calcein ermittelt.

Für die kovalente Verknüpfung von Aptamer und Polymer wurden zwei verschiedene Strategien getestet:

- Verknüpfung von NH_2 -derivatisierter PPAS und 5'-thiophosphorylierter RNA durch heterobifunktionelle Vernetzung mit Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimido-methyl]cyclohexan-1-carboxylat.
- EDC-medierte Modifikation von PPAS durch Adipinsäuredihydrazid und Reaktion des Hydrazid-derivatisierten Polymers mit der endständigen Aldehydgruppe 3'-oxidierter RNA durch reduktive Aminierung (siehe Abschnitt 3.3.3.2).

In keinem Fall konnte ein Konjugationsprodukt nachgewiesen werden, vermutlich da unter den hier getesteten Bedingungen die elektrostatische Abstoßung zwischen den beiden Polyanionen PPAS und 2-16 RNA eine Reaktion der Moleküle verhinderte. Aus diesem Grund wurde auch dieser Ansatz als unbrauchbar verworfen.

3.3.2 Modifikation von Aptamer 2-16 durch Melittin

Melittin ist die Hauptkomponente des Toxins der europäischen Honigbiene *Apis mellifera*, dessen hämolytische und zytotoxische Aktivität in vielen Arbeiten beschrieben wurde (Habermann, 1972; Dempsey, 1990; Raghuraman und Chattopadhyay, 2006). Es handelt sich dabei um ein aus 26 Aminosäuren bestehendes, lineares Peptid dessen Aminosäuresequenz einen amphipatischen Charakter nahe legt. Die ersten 20 Aminosäuren sind bis auf eine Ausnahme (Lys7) ungeladen und überwiegend unpolar, während unter den sechs Carboxy-terminalen Aminosäuren vier positiv geladene auftreten (Abbildung 21A). Es handelt sich demnach um ein kationisches Peptid, dessen Nettoladung von +5 bis +6 die Löslichkeit in wässriger Umgebung fördert. Dort kann Melittin in Abhängigkeit von Konzentration, pH und Salzgehalt in unterschiedlichen

Konformationen vorliegen. Die strukturelle Variabilität des Melittin Monomers reicht von dem ungeordneten Zufallsknäuel bis hin zur α -helikalen, amphiphatischen Struktur, wobei die letztere mit Membranen interagieren kann (Abbildung 21B) (Terwilliger und Eisenberg 1982 a & b; Dathe und Wieprecht, 1999). Es wurde gezeigt, dass sich vier α -helikale Melittin-Monomere zum Tetramer zusammenschließen können, wobei die Tetramerisierung die hämolytische Aktivität des Melittins inhibiert (Hider *et al.*, 1983). Allerdings ist bis heute der genaue Mechanismus der Membraninteraktion unklar, es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Interaktion in der Bildung von torroidalen Poren innerhalb der Phospholipiddoppelmembran resultiert. Im Fall von Erythrozyten, den natürlichen Zielzellen von Melittin, führt dies zur kolloid-osmotischen Lyse der Zelle. (Tosteson und Tosteson, 1981; DeGrado *et al.*, 1982; Tosteson *et al.*, 1985; Subbalakshmi *et al.*, 1999.)

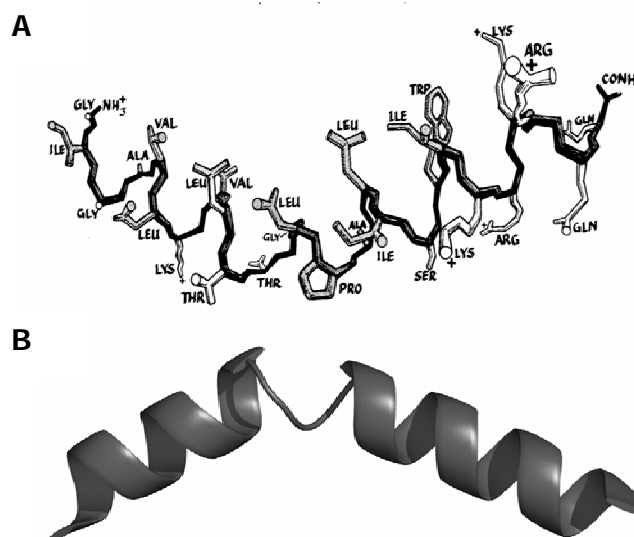


Abbildung 21: Die Aminosäurezusammensetzung von Melittin erlaubt die Bildung einer amphiphatischen Helix (A) Melittin besteht aus 21 unpolaren und 5 kationischen Aminosäuren, von denen 4 am C-terminalen Ende des Peptids liegen (Abbildung nach Terwilliger & Eisenberg, 1981) (B) Melittin kann eine amphiphatische, helikale Struktur ausbilden. Zwei Helices mit entgegengesetzten Windungsrichtungen sind über eine Schleife miteinander verbunden und bilden einen Winkel von ca. 120° (Struktur: 2MLT.pdb; Darstellung modifiziert durch PyMOL, DeLano Scientific).

3.3.2.1 Kovalente Verknüpfung von Melittin und Aptamer 2-16

Die kovalente Verknüpfung des Aptamers 2-16 und Melittin erfolgte durch reduktive Aminierung (siehe Abschnitt 3.3.3.2). Hierzu wurde die RNA am 3'-Ende durch Natriumperiodat oxidiert und unter reduktiven Bedingungen in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid mit einer primären Aminogruppe des Melittins verknüpft. Da Melittin über insgesamt sechs primäre Aminogruppen

verfügt, erfolgte die Verknüpfung nicht an einer bestimmten Stelle innerhalb der Sequenz, sondern an sechs verschiedenen Positionen innerhalb des Peptids, weshalb ein heterogenes Konjugationsprodukt erwartet wurde. Es bestand die Wahrscheinlichkeit, dass die Verknüpfung von RNA und Peptid die Inaktivierung des Peptids nach sich zieht, da zumindest die positiv geladene NH_2 -Gruppe des Lysin-Restes an Position 7 essentiell für die lytische Eigenschaft von Melittin ist (Blondelle und Houghten, 1991; Sitaram und Nagaraj, 1999). Gleichzeitig könnte die Verknüpfung mit der RNA die Zellbindung des Aptamers aus sterischen Gründen beeinflussen. Durch die zufällige Verknüpfung wurden alle möglichen Verknüpfungsvarianten in Abhängigkeit von der Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen hergestellt. Die Gesamtaktivität des entstehenden Produkts setzte sich demnach aus den Einzelaktivitäten der verschiedenen Konjugationsprodukte zusammen und so könnten eventuell entstehende inaktive Formen durch gleichzeitig entstehende aktive Varianten kompensiert werden.

Die Verknüpfungsreaktion wurde mit einem hundertfachen Überschuss des Peptids gegenüber der RNA durchgeführt, was zu Ausbeuten an verknüpfter RNA von bis zu 70 % führte. Dies wurde gelelektrophoretisch anhand der verringerten elektrophoretischen Mobilität des Konjugats im Vergleich zur freien RNA ermittelt (Abbildung 22).

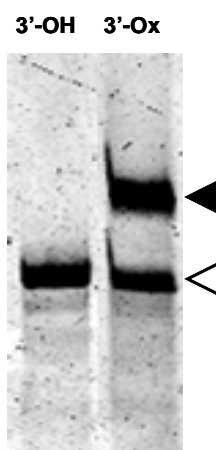


Abbildung 22: Kovalente Verknüpfung von Melittin und 3'-oxidiertem 2-16 RNA durch reduktive Aminierung. Die Inkubation von 3'-oxidiertem 2-16 RNA (3'-Ox) mit einem 100-fachen Überschuss an Melittin lieferte bis zu 70 % verknüpfte RNA. In Kontrollansätzen mit nicht-oxidiertem RNA (3'-OH) war kein Konjugationsprodukt detektierbar. (◁: nicht verknüpfte 2-16 RNA; ◼: 2-16~Melittin-Konjugat)

Es zeigte sich, dass die 2-16 RNA eine Reaktion mit Melittin eingehen konnte, jedoch kam es im Verlauf der Reaktion zur raschen Präzipitation sowohl der freien als auch der Melittin-verknüpften RNA. Diese Präzipitation war sehr wahrscheinlich auf die Aggregation der polyanionischen RNA und dem positiv geladenen Melittin zurückzuführen. Offensichtlich war diese Aggregation aber

nicht alleine auf ionische Wechselwirkungen der Moleküle zurückzuführen, da die Präzipitation auch in Gegenwart sehr hoher, Ladungs-kompensierender Salzkonzentrationen wie 2 M NaCl stattfand (Daten nicht gezeigt). Eine Behandlung mit 8 M Harnstofflösung oder DMSO führte hingegen zur Resolubilisierung des Präzipitats, jedoch konnten die Experimente zur Analyse der Zytotoxizität des Konjugats unter diesen Bedingungen nicht durchgeführt werden.

3.3.2.2 Maskierung von Melittin

Es wurde im Folgenden eine Strategie entwickelt, welche die Präzipitation der RNA in Gegenwart von Melittin verhindern sollte. Hierfür wurden die primären Aminogruppen innerhalb des Peptids durch die Modifikation mit einem Maleinsäureanhydrid-Derivat unter neutralen Reaktionsbedingungen maskiert (Rozema *et al.*, 2003). Diese Maskierung eliminiert in pH-abhängiger Weise die positive Ladung und damit auch die lytische Aktivität des Peptids (Abbildung 23A). Unter schwach sauren Bedingungen kann die Bindung zwischen primärer Aminogruppe und Maleinsäureanhydrid wieder gespalten werden, was zur Wiederherstellung der positiven Ladungen und damit zur Wiederherstellung der lytischen Aktivität des Melittins führt (Abbildung 23B).

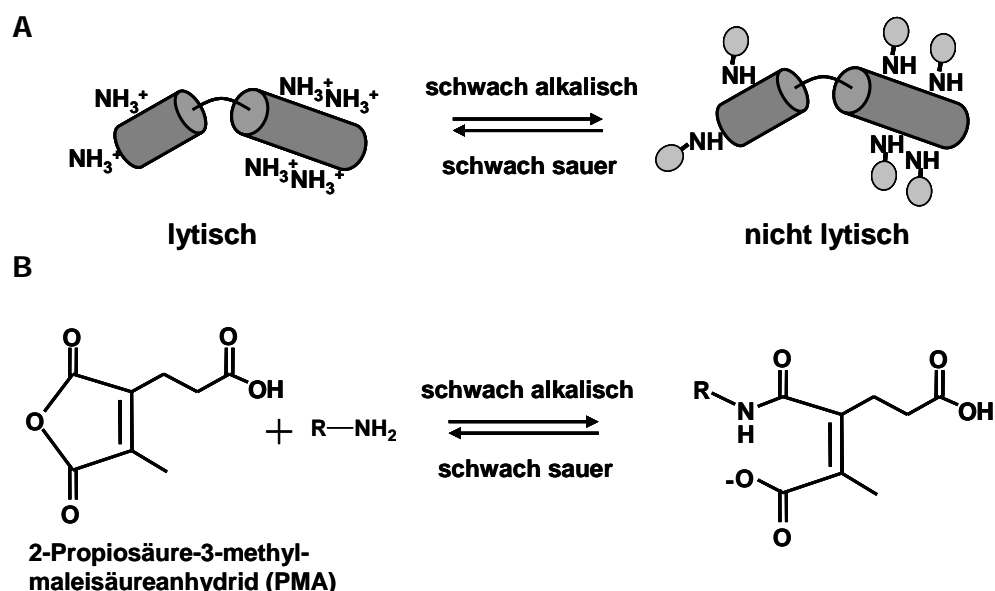


Abbildung 23 Die lytischen Eigenschaften von Melittin können pH-abhängig modifiziert werden. (A) Die lytische Aktivität von Melittin wird von der Anwesenheit positiv geladener Aminogruppen determiniert. Eine pH-abhängige Maskierung der Aminogruppen führt zum Verlust dieser Eigenschaft. (B) Primäre Aminogruppen können durch disubstituierte Maleinsäureanhydride wie 2-Propionsäure-3-methyl-maleinsäureanhydrid (PMA) pH-abhängig und reversibel maskiert werden.

Das disubstituierte Maleinsäureanhydrid-Derivat 2-Propionsäure-3-Methylmaleinsäureanhydrid (PMA, Abbildung 23B) wurde synthetisiert (Rozema *et al.*, 2003; Naganawa *et al.*, 1994). Die konzentrationsabhängige Reaktion zwischen Melittin und PMA konnte anhand einer kolorimetrischen Nachweisreaktion der primären Aminogruppen des Peptids mittels 2, 4, 6-Trinitrobenzolsulfonsäure analysiert werden, wobei PMA im 2- bis 10-fachen molaren Überschuss eingesetzt wurde. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme in der Anzahl von reaktiven Aminogruppen, was auf eine zunehmende Maskierung zurückzuführen war (Abbildung 24A). Die gleichen Maskierungsansätze wurden in Verknüpfungsreaktionen mit 3'-oxidierter 2-16 RNA eingesetzt und der jeweilige Anteil an löslicher RNA wurde quantitativ analysiert (Abbildung 24). Hier konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg im Anteil der löslichen RNA beobachtet werden. Betrachtete man jedoch den Anteil an löslichem Konjugationsprodukt, so zeigte sich, dass die maximale Menge an löslichem Konjugationsprodukt bei einem 4 bis 6-fachen molaren Überschuss von PMA gegenüber Melittin während der Maskierungsreaktion vorlag. Dies konnte anhand der Tatsache erklärt werden, dass ein erhöhter Maskierungsgrad zwar generell die Löslichkeit der RNA im System erhöht, jedoch gleichzeitig die Reaktionspartner für die reduktive Aminierungsreaktion zwischen RNA und Peptid eliminiert. Es existierte demnach ein optimales Melittin:PMA-Verhältnis bei einem ca. 5-fachen molaren Überschuss an PMA. Hier war offenbar die Ladung des Peptids auf 50 bis 70 % (vgl. Abbildung 24A) ausreichend herabgesetzt, um die Präzipitation der RNA zu minimieren. Gleichzeitig waren noch genug primäre Aminogruppen im System vorhanden um eine zufrieden stellende Ausbeute an löslichem Konjugationsprodukt zu erhalten.

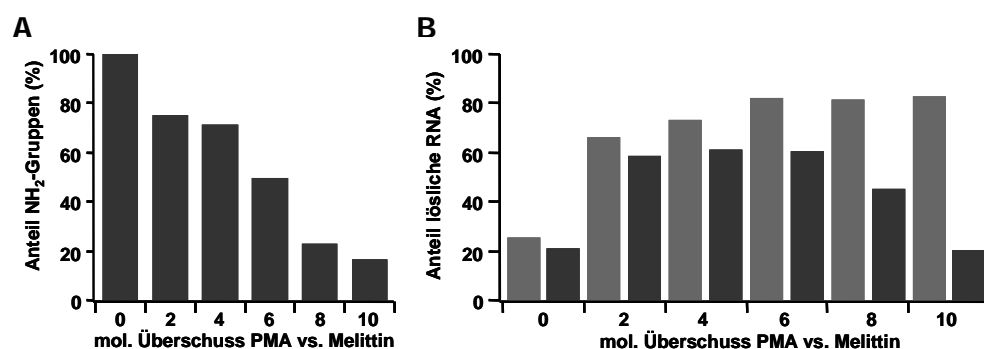


Abbildung 24: Der Maskierungsgrad von Melittin beeinflusst die Konjugationseffizienz und Löslichkeit. (A) Konzentrationsabhängige Maskierung der NH₂-Gruppen innerhalb des Melittin-Peptids. Melittin wurde mit steigendem molaren Überschuss an PMA maskiert und der Anteil reaktiver Aminogruppen mit Hilfe von TNBS analysiert. (B) Konzentrationsabhängig maskierte Melittin-Präparationen wurden in Verknüpfungsreaktionen mit 3'-oxidierter 2-16 RNA eingesetzt und der Anteil der löslichen RNA quantifiziert. Hellgraue Balken: gesamte lösliche RNA; dunkelgraue Balken: lösliches Konjugationsprodukt.

Die folgenden Verknüpfungsreaktionen wurden aus diesem Grund in Gegenwart von Melittin durchgeführt, das zuvor unter einem 5-fachen molaren Überschuss an PMA maskiert worden war. Das Konjugationsprodukt sollte dann auf unterschiedliche Weisen gereinigt werden: Es wurden verschiedene Methoden der Gelelektrophorese nach elektrophoretischer Trennung, Größenausschlusschromatographie, Dünnschichtchromatographie und hydrophobe Interaktionschromatographie getestet. Es zeigte sich jedoch, dass die Melittin-konjugierte RNA während dieser Reinigungsversuche erneut präzipitierte. Dies war vermutlich auf die Instabilität der Modifikation durch PMA zurückzuführen. Offensichtlich wurde die Bindung zwischen Maleinsäureanhydrid und primären Aminogruppen gespalten, ohne dass saure pH-Bedingungen angelegt wurden. Dies steht im Kontrast zu bereits publizierten Daten (vgl. Rozema, 2001), dennoch musste aus dem Grund der Ansatz an dieser Stelle verworfen werden.

3.3.3 Modifikation von Aptamer 2-16 durch GALA

GALA ist ein synthetisches Peptid, das ursprünglich zur Analyse der Membraninteraktion viraler Fusionsproteine entwickelt wurde (Subbarao *et al.*, 1987; Parente *et al.*, 1988). Es besteht aus 30 Aminosäuren folgender Sequenz:

WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA

Das Peptid enthält mehrere Wiederholungen des Tetrapeptids Glutaminsäure-Alanin-Leucin-Alanin (EALA), wobei Glutaminsäure zur Bereitstellung einer pH-abhängigen negativen Ladung dient. Zusätzlich enthält GALA einen Histidin- und einen Tryptophan-Rest als spektroskopische Sonden. Unter neutralen pH-Bedingungen liegt GALA negativ geladen in einer wasserlöslichen Konformation vor. Wird der pH in den sauren Bereich verschoben, so konvertiert die Struktur von GALA von einem Zufallsknäuel hin zu einer amphipatischen α -Helix, die an Membranen bindet (Abbildung 25A). Die EALA-Wiederholungen wurden angepasst, so dass das Peptid in seiner α -helikalen Konformation über eine hydrophobe Oberfläche verfügt, die mit Membranen interagieren kann (Abbildung 25B). Die Länge der Sequenz wurde außerdem so gewählt, dass sie im helikalen Zustand mit 48 Å eine Lipiddoppelmembran durchspannen kann. GALA kann unter sauren Bedingungen und bei ausreichend hoher Konzentration an GALA-Monomeren eine Transmembran-Pore ausbilden, die aus 10 ± 2 α -helikalen GALA-Monomeren besteht, welche senkrecht zur Membran ausgerichtet sind (Li *et al.*, 2004).

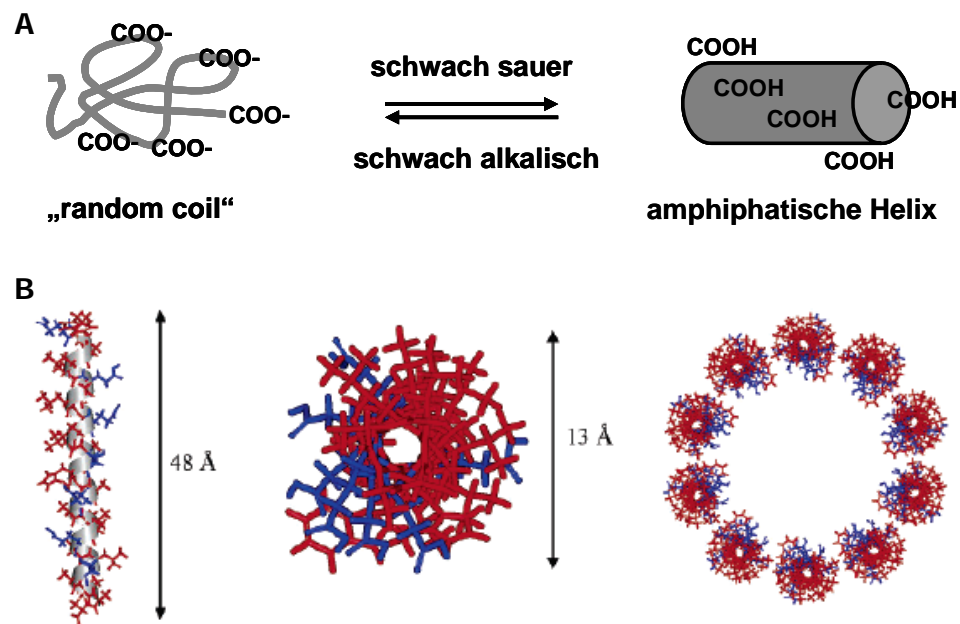


Abbildung 25 GALA besitzt amphipathische, Poren-bildende Eigenschaften. (A) Bei neutralem und schwach basischem pH liegt GALA als „random coil“ vor, während unter schwach sauren Bedingungen die Konformation zu einer amphipathischen Helix konvertiert. (B) Die Helix zeigt eine asymmetrische Verteilung von hydrophoben und geladenen Aminosäuren. blau: geladen; rot: hydrophob; links: Seitenansicht; rechts: Aufsicht der GALA-Helix. Es kann eine Pore bestehend aus 10 GALA Monomeren innerhalb von Lipiddoppelmembran ausgebildet werden (rechts) (Abbildung entnommen aus Choi *et al.*, 2006).

3.3.3.1 Zytotoxische Aktivität von GALA gegenüber Blutstrom-Trypanosomen

Die Zytotoxizität von GALA gegenüber Blutstrom-Trypanosomenzellen wurde unter neutralen Bedingungen getestet. Hierfür wurden Blutstrom-Trypanosomenzellen zunächst bei pH 7,4 in Gegenwart verschiedener GALA-Konzentrationen zwischen 3 nM bis zu 50 µM inkubiert. Der Anteil der überlebenden Zellen wurde im Anschluss daran mit Hilfe eines fluoreszenz-basierten Nachweis lebender Zellen detektiert (Abbildung 26). Es zeigte sich hierbei, dass GALA im getesteten Konzentrationsbereich keinen konzentrations-abhängigen Einfluss auf das Überleben der Trypanosomenzellen ausübte. Lediglich eine Schwankung von in Einzelfällen bis zu 18 % um den Kontrollwert kann beobachtet werden, wobei es sich höchstwahrscheinlich um experimentelle Variation handelt.

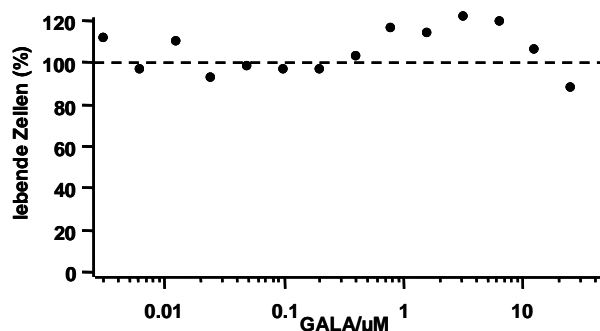


Abbildung 26: GALA zeigt keine zytotoxische Aktivität unter neutralen Bedingungen. Blutstrom-Trypanosomen wurden mit GALA in einem Konzentrationsbereich von 3 nM bis 50 μ M inkubiert und der Anteil der lebenden Zellen im Vergleich zu einem Kontrollansatz ohne GALA analysiert. Die gestrichelte Linie verdeutlicht den 100 %-Wert im Vergleich zu den Meßwerten.

3.3.3.2 Kovalente Verknüpfung von Aptamer 2-16 und GALA durch reduktive Aminierung

Die kovalente Verknüpfung zweier Moleküle durch reduktive Aminierung erfolgt durch die Reaktion einer Carbonylgruppe, üblicherweise ein Aldehyd oder ein Keton, mit einer meist primären Aminogruppe. Diese reagieren in wässrigen Bedingungen unter Wasserabspaltung reversibel zum Imin. Dieses instabile Intermediat kann in Gegenwart eines reduzierenden Agens wie Natriumcyano-borhydrid zum stabilen Amid reduziert werden (Abbildung 27B).

Die kovalente Verknüpfung von Aptamer 2-16 und GALA erfordert die Einführung einer Carbonylgruppe in das RNA-Molekül. Aus diesem Grund wurde das Aptamer mit Natriumperiodat behandelt, was zur Oxidation der 3'-terminalen Ribose und damit zur Generierung 3'-terminaler Aldehydgruppen führte (Abbildung 27A). Die 3'-terminale Oxidation wurde überprüft, indem oxidierte und nicht-oxidierte RNA-Präparationen einer Ligationsreaktion mit dem radioaktiv markierten CDP-Derivat 3',5'-[32 P]-Cytidindiphosphat mit Hilfe der T4-RNA-Ligase unterzogen wurde. Diese kann keine oxidierten 3'-RNA-Enden als Substrat umsetzen. Im Fall der oxidierten RNA konnte kein Ligationsprodukt detektiert werden, was die vollständige Oxidation der RNA belegt (Abbildung 27B).

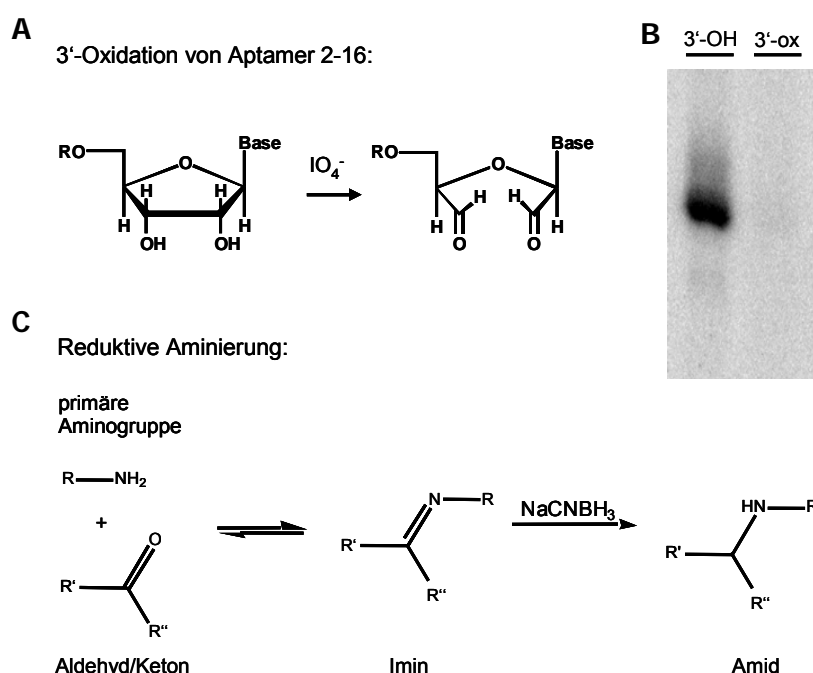


Abbildung 27: Strategie der kovalenten Verknüpfung von Melittin und Aptamer 2-16. (A) Zur Generierung einer endständigen Carbonylgruppe wurde die 2-16 RNA am 3'-Ende durch Behandlung mit Natriumperiodat oxidiert, was in der Bildung von Aldehydgruppen resultiert. (B). Die Effizienz der Oxidation wurde ermittelt, indem die Ligierbarkeit der oxidierten RNA mit dem radioaktiv markierten Nukleotid 3',5'-[³²P]-Cytidindiphosphat getestet wurde. Bei der Verwendung von nicht-oxidierten RNA (3'-OH) entsteht dabei ein radioaktiv markiertes und somit im denaturierenden Polyacrylamidgel detektierbares Ligationsprodukt. Im Fall der 3'-oxidierten RNA (3'-ox) konnte kein Ligationsprodukt detektiert werden, die RNA war demnach vollständig oxidiert und somit kein Substrat für die Ligationsreaktion. (C) Die Aldehyd-Funktion kann mit primären Aminogruppen reagieren, was unter reduktiven Bedingungen zur Bildung einer stabilen Amid-Bindung führt.

Die Verknüpfung der 3'-oxidierten 2-16 und GALA erfolgte durch reduktive Aminierung der oxidierten RNA durch die primäre Aminogruppe am Aminoterminus des Peptids (Abbildung 27C). Als reduzierendes Agens wurde Natriumcyanoborhydrid eingesetzt. Die Effizienz dieser Reaktion ist abhängig vom Verhältnis der eingesetzten Reaktanden und sollte zunächst optimiert werden. Aus diesem Grund wurde die 3'-oxidierte RNA mit einem hundertfachen und einem tausendfachen molaren Überschuss an GALA inkubiert. Der Anteil der GALA-konjugierten RNA wurde analysiert, wobei anhand der verringerten gelelektrophoretischen Mobilität des Konjugats freie von Peptid-verknüpfte RNA-Population unterschieden wurde. Es zeigte sich hierbei, dass die Ausbeute bei einem hundertfachen molaren Überschuss von GALA gegenüber der RNA 2,7 % betrug, während ein tausendfacher Überschuss die Ausbeute auf 16,5 % erhöhte (Abbildung 28). Zur Kontrolle wurde nicht-oxidierte 2-16 RNA eingesetzt, wobei kein Reaktionsprodukt detektiert werden konnte.

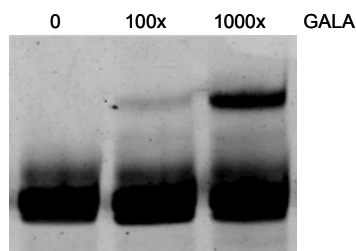


Abbildung 28: Die Effizienz der Verknüpfungsreaktion ist abhängig vom eingesetzten molaren Verhältnis von RNA und Peptid. Die Reaktion von 3'-oxidiert 2-16 RNA und GALA wurde mit einem 100-fachen oder einem 1000-fachen Überschuss des Peptids inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde anhand seiner verringerten elektrophoretischen Mobilität in denaturierenden Polyacrylamidgelen analysiert.

Die Reaktion wurde bei pH 8 durchgeführt, also in einem pH-Bereich in dem die Glutaminsäureseitenketten innerhalb von GALA deprotoniert vorliegen und somit das Peptid negativ geladen ist. Es war denkbar, dass die Reaktion durch die elektrostatische Abstoßung des negativ geladenen Peptids und des RNA-Polyanions inhibiert wurde. Aus diesem Grund wurde der Ladungs-maskierende Einfluss von monovalenten Kationen auf die Reaktion untersucht. Die Reaktion wurde durch die Gegenwart von bis zu einer Konzentration von 2 M NaCl kaum beeinflusst (Abbildung 29A). Die Zugabe von KCl hingegen zeigte einen Effekt. Hier stieg die Ausbeute der Reaktion bis zu einer Konzentration von 540 mM KCl konzentrationsabhängig auf bis zu 49 % an, während höhere Konzentrationen zu einem Rückgang der Effizienz führten (Abbildung 29B).

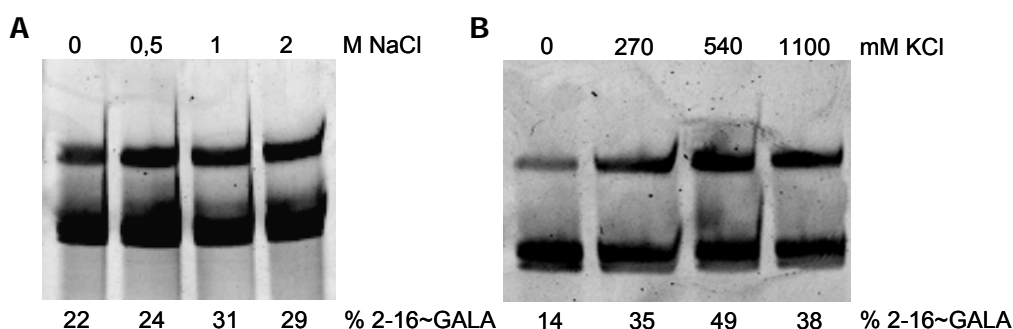


Abbildung 29 Die Effizienz der Verknüpfungsreaktion kann durch die Zugabe von monovalenten Kationen beeinflusst werden. Die Verknüpfungsreaktion von 3'-oxidiert 2-16 RNA wurde unter verschiedenen NaCl- und KCl-Konzentrationen durchgeführt. Das 2-16~GALA-Verknüpfungsprodukt wurde gelelektrophoretisch analysiert und quantifiziert. (A) Zugabe von 0 bis 2 M NaCl zum Reaktionsansatz hat nur einen marginalen Einfluss auf die Effizienz der Reaktion. (B) Die Effizienz der Verknüpfung kann durch Zugabe von KCl verbessert werden.

3.3.3.3 Bindung des 2-16~GALA-Konjugats an Trypanosomenzellen

Die Modifikation eines Aptamers kann dessen Struktur und damit auch die Funktion beeinflussen und im Extremfall komplett inhibieren. Es ist deshalb notwendig modifizierte Aptamer-Präparationen auf ihre Funktion zu überprüfen. Aus diesem Grund wurde intern Biotin-modifizierte 2-16 RNA durch Natriumperiodat oxidiert und einer Verknüpfungsreaktion mit GALA unterzogen. Das 2-16_{bio}~GALA-Konjugat wurde gelelektrophoretisch von unmodifizierter RNA getrennt und aus dem Gel eluiert. Das derart gereinigte biotinylierte Konjugationsprodukt wurde mit lebenden Blutstrom-Trypanosomenzellen inkubiert. Die Inkubation wurde bei 4°C durchgeführt um die Endozytose des Konjugats und eventuell daraus resultierende zytotoxische Effekte zu verhindern. Zellgebundenes 2-16_{bio}~GALA-Konjugat wurde dann durch einen Cy3-konjugierten α -Biotin-Antikörper detektiert. Unter diesen Bedingungen konnte das biotinylierte 2-16~GALA-Konjugat in der flagellaren Tasche der Trypanosomenzellen detektiert werden (Abbildung 30). Die Bindung erfolgte demnach an dieselbe Bindestelle wie die der unmodifizierten 2-16 RNA und war qualitativ nicht beeinflusst von der Verknüpfung der RNA mit dem GALA Peptid.

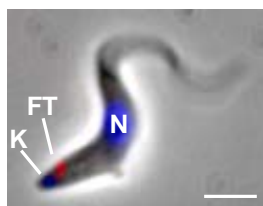


Abbildung 30: Das 2-16~GALA-Konjugat bindet an die flagellare Tasche von Blutstrom-Trypanosomen. Ko-transkriptionell biotinyliertes Aptamer 2-16 wurde mit GALA verknüpft und auf Eis mit lebenden Blutstrom-Trypanosomen inkubiert. Zellgebundenes Konjugat wurde mithilfe eines Cy3-konjugierten α -Biotin-Antikörper in der flagellaren Tasche der Parasiten detektiert. Nukleäre und Kinetoplasten-DNA wurde mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). FT: flagellare Tasche; K: Kinetoplast; N: Nukleus. Skalierungsbalken: 5 μ m.

3.3.3.4 Zytotoxizität des 2-16~GALA-Konjugats

In vergrößerten Konjugationsansätzen wurden bis zu 100 μ g 3'-oxidierte 2-16 RNA eingesetzt. Zur Aufreinigung wurde zunächst das ungebundene GALA-Peptid durch Größenausschlusschromatographie abgetrennt und zur Wiederverwertung konzentriert. Das Konjugationsprodukt wurde wie im Fall des 2-16_{bio}~GALA-Konjugats durch Gelelektion von unmodifizierter RNA gereinigt. Auf diese Weise wurde ausreichend 2-16~GALA-Konjugationsprodukt erzeugt um Experimente bezüglich der Zytotoxizität des Konjugats durchzuführen. Hierfür wurden Trypanosomen der Blutstromform mit verschiedenen Konzentrationen des Konjugats bis zu einer maximalen Konzentration von 10 μ M inkubiert und der

Anteil der überlebenden Zellen wie zuvor beschrieben durch einen fluoreszenz-basierten Nachweis ermittelt (Abbildung 31A). Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Rückgang in der Zahl lebender Zellen, wobei ein LD_{50} von 3 μM ermittelt werden konnte und bei 10 μM nahezu alle Zellen abgetötet waren (Abbildung 31B). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit je 10 μM nicht-verknüpfter 2-16 RNA sowie GALA inkubiert, wobei keine zytotoxische Aktivität im Vergleich zum Konjugat sichtbar war (Abbildung 31C). Somit sind unter den hier beschriebenen Bedingungen eine Anzahl von $6 \cdot 10^7$ 2-16~GALA Molekülen pro Zelle zum Abtöten notwendig.

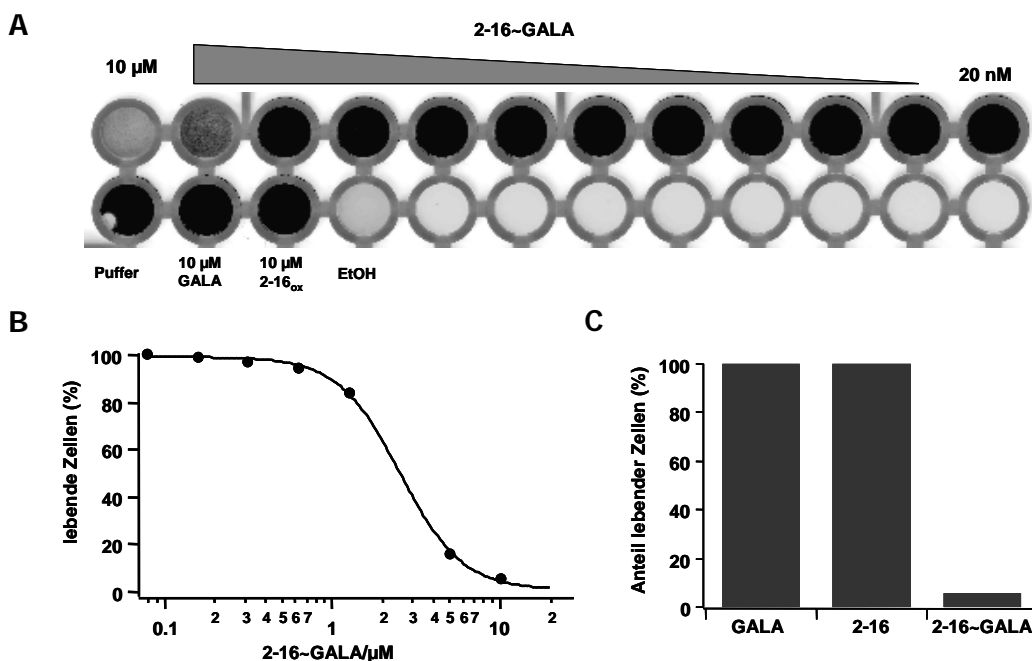


Abbildung 31: Zytotoxischer Effekt des 2-16~GALA Konjugats auf Blutstrom-Trypanosomen. (A) Blutstrom-Trypanosomen wurden mit dem 2-16~GALA-Konjugats inkubiert, wobei ein Konzentrationsbereich von 20 nM bis 10 μM abgedeckt wurde. Lebende Zellen wurden anhand des Umsatzes von Calcein-AM zum fluoreszierenden Calcein nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden Zellen mit 10 μM GALA bzw. 3'-oxidierter 2-16 RNA sowie in 50 % (v/v) EtOH inkubiert. (B) das 2-16~GALA-Konjugat zeigt einen konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt auf Blutstrom-Trypanosomen, wobei 50 % der Zellen bei einer Konzentration von 3 μM abgetötet wurden. (C) Nur 6 % der eingesetzten Zellen überlebten die Inkubation mit dem 2-16~GALA-Konjugat, während nach Inkubation mit 10 μM GALA oder 2-16 RNA kein Absterben der Zellen zu beobachten war.

3.3.3.5 Visualisierung der lytischen Aktivität des 2-16~GALA-Konjugats

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das 2-16~GALA-Konjugat an die flagellare Tasche von Blutstrom-Trypanosomen bindet und einen konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt auf die Parasiten

ausübt. Es soll im Folgenden der Modus der beobachteten Zytotoxizität analysiert werde. GALA wurde entwickelt, um in einem pH-abhängigen Mechanismus Poren in den Membranen saurer Kompartimente wie Endo- oder Lysosomen zu bilden, ein Vorgang, der zum Absterben der Trypanosomenzellen führt (Pérez-Morga *et al.*, 2005). Da das 2-16~GALA-Konjugat an die selbe Bindestelle wie das 2-16 Aptamer bindet, liegt es nahe, auch einen ähnlichen endozytotischen Aufnahmeweg anzunehmen. Demnach würde sich das Konjugat in sauren Kompartimenten und insbesondere im Lysosom der Zelle anreichern und könnte zum dortigen Verlust der Membranintegrität und daraus resultierend zum osmotischen Anschwellen der Kompartimente führen. Dieser Effekt kann durch Beladung der endozytotischen Kompartimente mit dem Flüssigphasen-Marker Dextran visualisiert werden (Engstler *et al.*, 2004).

Blutstrom Trypanosomemenzellen wurden mit fluoreszenzmarkiertem Dextran (Molekulargewicht: 10 kDa) inkubiert. Das fluoreszenzmarkierte Dextran wurde von den Zellen endozytiert und reichte sich in Endosomen bzw. schlussendlich im Lysosom der Parasiten an, wo es als punktförmige Fluoreszenz im Bereich zwischen Nukleus und Kinetoplast detektiert werden konnte. Nachdem nicht-endozytiertes Dextran entfernt worden war, wurden die Zellen in Gegenwart oder in Abwesenheit von 10 μM des 2-16~GALA-Konjugats inkubiert. In den Kontrollzellen, die ohne das Konjugat inkubiert wurden, konnte über den Zeitraum von einer Stunde kein Verlust an Fluoreszenzsignal innerhalb der Zellen beobachtet werden (Abbildung 32A). Die Zellen in Gegenwart des Konjugats zeigten bereits nach 30 min ein anderes Bild. Insgesamt war die Fluoreszenzintensität in dieser Probe geringer, offensichtlich wurde das fluoreszenzmarkierte Dextran zumindest teilweise aus den endozytotischen Kompartimenten freigesetzt. Das verbleibende Signal zeigte eine veränderte Verteilung innerhalb der Zelle (Abbildung 32D). Während in den Kontrollzellen ein prominentes punktförmiges Signal eindeutig das Lysosom bzw. in Einzelfällen auch endosomale Vesikel markierte, herrschte in den 2-16~GALA-behandelten Zellen eine eher ungeordnete Verteilung des Signals vor. Zwar waren auch hier punktförmige Fluoreszenzsignale detektierbar, diese waren jedoch gestreut und von einem diffusen Signal umgeben. Auffällig war, dass sich das Signal in keinem Fall über den gesamten zytosolischen Bereich der Zelle erstreckte, sondern auf den Bereich zwischen Nukleus und Kinetoplast beschränkt war.

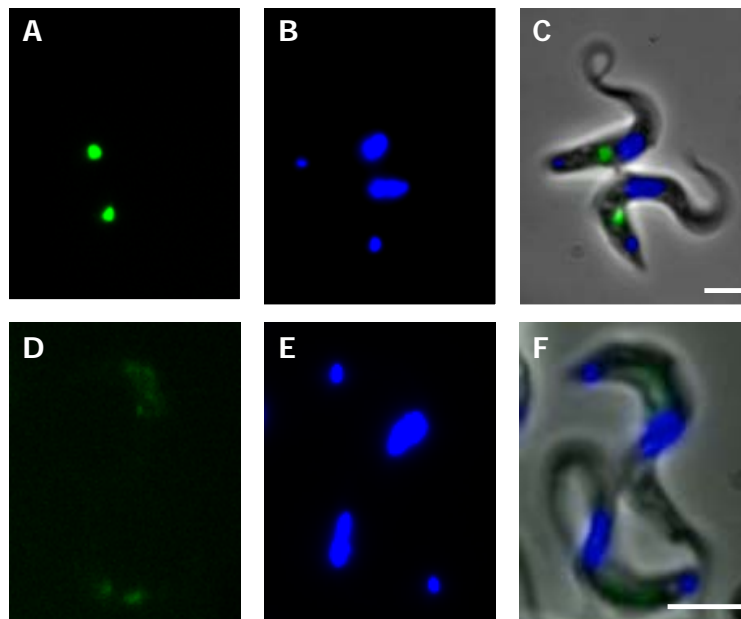


Abbildung 32: Einfluss des 2-16~GALA-Konjugats auf die Integrität der endozytotischen Kompartimente. Blutstrom-Trypanosomen wurden mit fluoreszenzmarkiertem Dextran (10 kDa) beladen, das sich im Lysosom der Zellen anreichert. Die beladenen Zellen wurden in Gegenwart (A-C) oder in Abwesenheit (D-F) des 2-16~GALA-Konjugats inkubiert. (A+C): Das punktförmige Signal des Alexa-Fluor488-markierten Dextrans (grün) zeigt nach Inkubation mit dem 2-16~GALA Konjugat eine diffuse Verteilung. (B+E): Nukleäre und Kinetoplasten-DNA wurde durch Hoechst 33342 gefärbt. (C+F): Vereinigung von (A+B) bzw. (D+E) mit dem Phasenkontrast-Bild der Zellen. Skalierungsbalken: 5 µm.

3.4 Kompetitive Bindeanalysen

Der Vorteil von Nukleinsäureaptameren als therapeutisch aktive Substanzen liegt in ihrer hohen Affinität und Spezifität gegenüber ihrem Zielmolekül. Zudem kann die Selektion der Aptamere flexibel gestaltet werden, weshalb die unterschiedlichsten Zielmoleküle bearbeitet werden können. Es bestehen jedoch auch Nachteile, die insbesondere die hohen Synthesekosten sowie die limitierte Anwendbarkeit von Nukleinsäuren als therapeutische Moleküle betreffen. In den vorangegangenen Abschnitten wurde exemplarisch anhand des Trypanosomen-spezifischen Aptamers 2-16 gezeigt, dass die pharmakokinetischen Eigenschaften von Aptameren nach der Selektion optimiert werden können, ohne dass sie ihre ursprünglichen Bindeeigenschaften verlieren. Eine Verringerung der Synthesekosten wird durch diesen Prozess jedoch nicht erreicht, tatsächlich führt jede Modifikation zu einer Erhöhung des finanziellen Aufwands.

Aus diesem Grund besteht ein anderer Ansatz in der Verwendung von Aptameren darin, die Aptamere nicht selbst als Therapeutika einzusetzen, sondern indirekt zur Identifizierung von anderen therapeutisch aktiven Molekülen zu verwenden. Hierbei werden Aptamere genutzt um Molekülbibliotheken bestehend aus niedermolekularen Substanzen auf Moleküle mit Aptamer-verdrängenden Eigenschaften zu durchsuchen (Green 2001). Dieses Verfahren kann im Hochdurchsatz-Maßstab durchgeführt werden und so auf schnellem und einfachem Weg Substanzen liefern, die erwünschte Eigenschaften von Aptameren besitzen und gleichzeitig deren unerwünschte Limitierungen umgehen. Es kann auf diese Weise gelingen Aptamere z.B. durch Serum-stabile oder oral applizierbare Moleküle von geringer Größe zu ersetzen und so deren enorme Synthesekosten zu umgehen.

3.4.1 Konkurrenz der Bindung von Aptamer 2-16 durch Substanzen einer Naturstoffbibliothek

3.4.1.1 Bindeanalysen in Gegenwart von kompetierenden Substanzen

Es wurde eine Molekülbibliothek getestet, die aus 1028 Substanzen unterschiedlichster Herkunft bestand. Diese Bibliothek stellte eine repräsentative Auswahl aus einer 8750 Komponenten umfassenden Naturstoffbibliothek dar. Bei den getesteten Molekülen handelte es sich um mikrobielle, pflanzliche, tierische und marine Substanzen sowie Naturstoffderivate und synthetische Naturstoffanaloga. Der Anteil der jeweiligen Substanzklasse innerhalb der Auswahl ist in Abbildung 33 dargestellt.

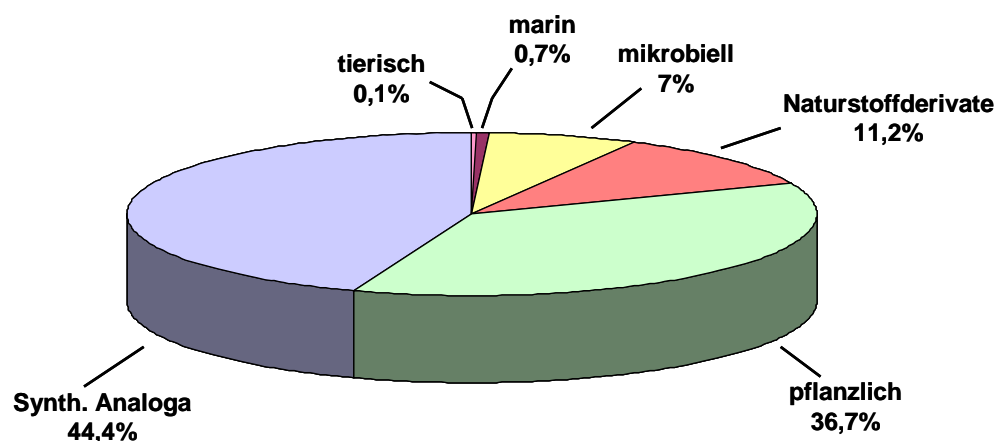


Abbildung 33 Die Herkunft der Naturstoffbibliothek. Die 1028 Substanzen, die in kompetitiven Bindeanalysen getestet wurden, konnten anhand ihrer Herkunft in sechs Gruppen eingeteilt werden.

Es konnte eine hohe strukturelle Variabilität innerhalb der Bibliothek erreicht werden, indem die unterschiedlichsten Substanzklassen zusammengestellt wurden (Abbildung 34), jedoch besteht die Bibliothek zu mehr als 40 % aus heterozyklischen, aromatischen und terpenoiden Substanzen. Die molekularen Massen der getesteten Moleküle lagen soweit bekannt in der Regel zwischen 200 und 500 Da, wobei insgesamt ein Bereich von ca. 100 – 3500 Da abgedeckt wurde.

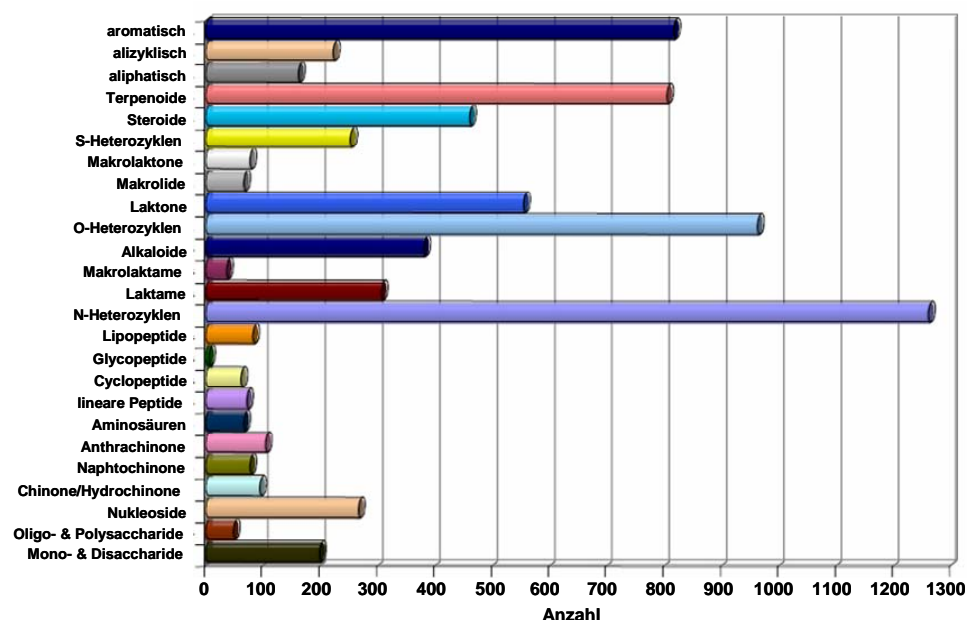


Abbildung 34 Die Diversität der Naturstoffbibliothek. Die Substanzen innerhalb der Naturstoffbibliothek gehörten den unterschiedlichsten Stoffklassen an, wobei zyklische Verbindungen den Hauptanteil ausmachten.

Die Substanzen wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL in DMSO gelöst bereitgestellt. Aus technischen Gründen wurden in den folgenden kompetitiven Bindeexperimenten alle Substanzen mit einer Massenkonzentration von 30 µg/mL eingesetzt. Es ergaben sich hierbei molare Konzentrationen von 8,6 - 268 µM, wobei der überwiegende Teil der Ansätze eine molare Konzentration von 60 – 150 µM an zu testender Substanz aufwies. Die kompetitiven Bindeexperimente wurden mit Aptamer 2-16 durchgeführt, das mit einem K_d von 10 nM an die flagellare Tasche von Blutstrom-Trypanosomen bindet. Es wurde ca. 20 pM intern ^{32}P -markierte 2-16 RNA pro Ansatz eingesetzt. Die zu testenden Komponenten wurden demnach mit einem mehr als 10^6 -fachen Überschuss gegenüber der RNA verwendet, um eine Konkurrenz auch bei weniger affinen Bindungen detektieren zu können. Die Bindeexperimente fanden in Gegenwart von tRNA und BSA als heterologe Kompetitoren statt, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen den zu testenden Komponenten und den Proteinen an der trypanosomalen Oberfläche sowie der RNA abzusättigen. RNA und zu testende Substanz wurden gleichzeitig mit $2 \cdot 10^7$ Blutstrom-Trypanosomenzellen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO anstatt der zu testenden Substanz eingesetzt, als Positivkontrolle wurde unmarkierte 2-16 RNA als homologer Kompetitor verwendet. Die zellgebundene RNA wurde von der freien RNA durch Zentrifugation durch eine organische Phase getrennt und der Anteil gebundener RNA in den Ansätzen bestimmt.

In Abbildung 35 ist ein repräsentatives Ergebnis der kompetitiven Zellbindungsexperimente dargestellt. Hierbei wurde der Anteil gebundener RNA innerhalb der Ansätze normiert, indem der Anteil gebundener RNA in der Negativkontrolle, d.h. in Abwesenheit von kompetierenden Substanzen, vom Anteil der gebundenen RNA in Gegenwart der jeweiligen Komponente subtrahiert wurde. Es ergaben sich hierbei überwiegend Werte, die um den normierten Wert der Negativkontrolle schwankten. Allerdings ist auch bei der Betrachtung der Negativkontrollen der einzelnen Experimente eine ähnliche Variation festzustellen. Der Mittelwert für die Negativkontrolle lag bei 19,2 % gebundener RNA, wobei die Standardabweichung $\pm 6,2$ % betrug. Demnach schwankten die Werte für die Negativkontrolle um bis zu 30 Prozentpunkte um den Mittelwert und diese Hintergrundschwankung ist ebenfalls bei den anderen Proben zu beobachten. Aufgrund dessen wurde für jedes Experiment durch die Betrachtung der dazugehörigen Negativkontrolle ein Schwellenwert festgelegt, anhand dessen die „Treffer“ ermittelt wurden. Um die Anzahl der „Treffer“ und damit die Wahrscheinlichkeit für die Auswahl von falsch-positiven Proben gering zu halten, wurde dieser Schwellenwert möglichst niedrig gewählt (vgl. Abbildung 35, gestrichelte Linie). Es wurden aufgrund dieses Auswahlverfahrens 29 Substanzen als positiv betrachtet und weiter analysiert. Diese 29 Komponenten stammen aus den unterschiedlichsten Stoffklassen: es handelte sich um sechs

Substanzen mikrobieller Herkunft, sechs Naturstoffderivate, 13 pflanzliche Stoffe und vier synthetische Naturstoffanaloga.

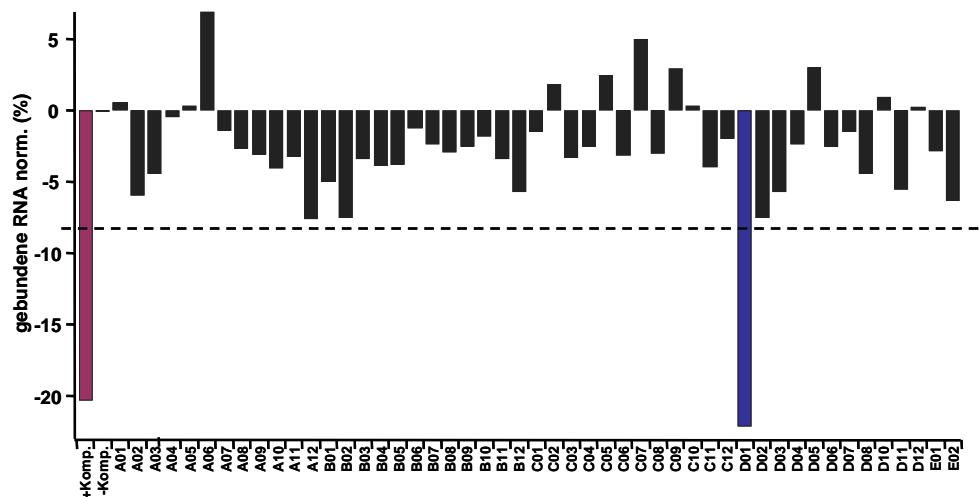


Abbildung 35 Repräsentative Auswertung der kompetitiven Bindeanalysen. Lebende Blutstrom-Trypanosomen wurden mit ^{32}P -markierter 2-16 RNA in Gegenwart (A01 – E02) oder in Abwesenheit (-Komp.) von kompetierenden Substanzen aus der Naturstoffbibliothek inkubiert und der Anteil an gebundener RNA wurde bestimmt. Als Positivkontrolle (+Komp., roter Balken) wurde dem Ansatz ein Überschuss an unmarkierter 2-16 RNA zugegeben. Die ermittelten Werte wurden anhand der Negativkontrolle (-Komp.) normiert, indem dieser Wert von allen anderen Werten subtrahiert wurde. Es ein Schwellenwert definiert (gestrichelte Linie) anhand dessen „Treffer“-Substanzen ausgewählt wurden, die eine signifikante Verdrängung der RNA Bindung aufweisen (blauer Balken).

3.4.1.2 Bestimmung des K_{dC} und Identifizierung von falsch-positiven „Treffern“

Im Weiteren wurde die konzentrationsabhängige Verdrängung der 2-16 RNA durch zuvor als positiv identifizierte Substanzen getestet. Hierfür wurde von jeder Substanz eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt, die einen Konzentrationsbereich von 15 $\mu\text{g/ml}$ bis 29 $\text{ng}/\mu\text{L}$ abdeckte. Diese Verdünnungsreihen wurden in kompetitiven Bindeexperimenten getestet. Es zeigte sich, dass nur sieben der getesteten Substanzen eine konzentrationsabhängige Verdrängung der 2-16 RNA aufwiesen, demnach handelte es sich bei den übrigen 22 Substanzen um falsch-positiv getestete Komponenten.

Zusätzlich wurden die Substanzen auf ihre Zytotoxizität getestet. Hierfür wurden Blutstrom-Trypanosomenzellen in Gegenwart von 30 $\mu\text{g/mL}$ der jeweiligen Substanz inkubiert und der Anteil noch lebender Zellen mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Nachweises quantifiziert. Es zeigte sich, dass 19 der getesteten Komponenten eine zytotoxische Wirkung auf die Trypanosomenzellen ausübten. Demnach war der zuvor gemessene Rückgang in der Bindung von

Aptamer 2-16 nicht auf eine kompetierende Aktivität der betreffenden Substanzen zurückzuführen. Da die Versuchsdurchführung nur die Detektion von RNA erlaubte, die an lebende Zellen gebunden vorlag, wurde im Fall der toxischen „Treffer“ der Rückgang des gemessenen Bindeanteils durch das Absterben der Zellen verursacht. Um nun die Substanzen zu ermitteln, die sich als wahre positive „Treffer“ auswiesen, also trotz konzentrationsabhängiger Verdrängung des Aptamers keine zytotoxische Aktivität zeigten, wurden die Daten aus den bisherigen Experimenten zusammengetragen und kombiniert ausgewertet, wobei alle relevanten Daten in Tabelle 3 zusammengefasst sind.

Nur zwei der getesteten Substanzen wiesen eine konzentrationsabhängige Verdrängung von Aptamer 2-16 auf, ohne dass die Zellen durch die Gegenwart der betreffenden Komponente beeinträchtigt wurden. Hier konnte analog zur K_d -Bestimmung die Konzentration an Kompetitorsubstanz ermittelt werden, bei der der Anteil an gebundener 2-16 RNA nur noch 50 % des Maximalwertes betrug (K_{dC}). Bei den betreffenden Komponenten handelte es sich um das mikrobielle Triterpen Quercinsäure (Position P51 A4), das ursprünglich aus *Daedalea quercina*, dem Eichenwirrling, einem Pilz aus der Familie der *Polyporaceae* isoliert wurde (Rösecke & König 2000) (Abbildung 36A). Die zweite Komponente war ein bisher Naturstoffderivat (Position P49 B8), das bisher nicht näher charakterisiert wurde. Quercinsäure verdrängte die 2-16 RNA mit einem K_{dC} von 700 nM (Abbildung 36B), während das Naturstoffderivat einen K_{dC} von 0,7 $\mu\text{g/mL}$ aufwies, was einer geschätzten molaren Konzentration von ca. 1 μM entsprach (Daten nicht gezeigt). Die Verdrängung der 2-16 RNA fand demnach in einem Konzentrationsbereich statt, der zwei bis drei Größenordnungen über dem K_d des Aptamers lag.

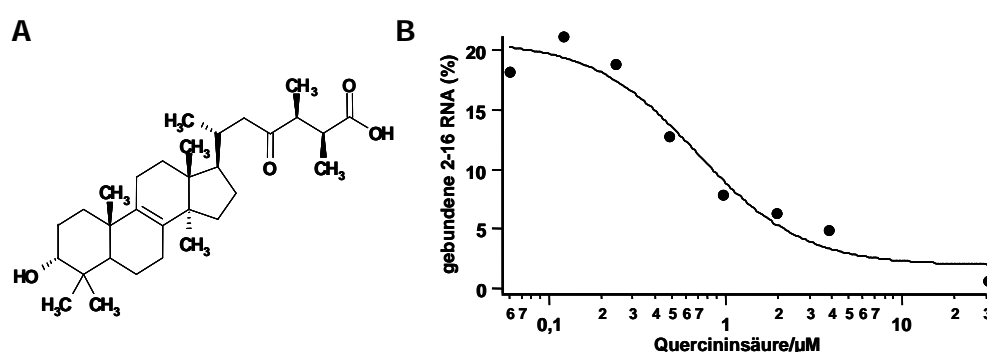


Abbildung 36: Quercinsäure konnte als Aptamer 2-16 verdrängende Substanz aus der Naturstoffbibliothek isoliert werden. (A) Struktur von Quercinsäure. Es handelt sich um ein Triterpen, das zuerst aus dem ungenießbaren Pilz *Daedalea quercina* isoliert wurde. (B) Quercinsäure zeigt eine konzentrationsabhängige Verdrängung der Bindung von Aptamer 2-16 an lebende Trypanosomenzellen (K_{dC} = 0,7 μM).

Tabelle 3: Zusammenfassung der Daten für die in den Verdrängungs-experimenten positiv getesteten Substanzen. 19 der 29 Substanzen zeigten eine zytotoxische Aktivität (+). Nur zwei der nicht als toxisch getesteten Komponenten (-) zeigten eine konzentrationsabhängige Verdrängung des Aptamers. Position: Die Position der Substanz innerhalb eines Sets an 96-well-Mikrotiterplatten, P: Plattennummer; A1 – H12: Position auf der Platte. MG: Molekulargewicht. n.b.: Es konnte kein K_{dc} bestimmt werden. *: nur Massenkonzentration bekannt.

Name	Position	MG (g/mol)	Herkunft	K_{dc} (μ M)	Toxizität
unbekannt	P49 B8	unbekannt	Naturstoffderivat	0,7 μ g/mL*	-
Magnolol	P49 C4	266,34	pflanzlich	1	+
2,4,5-Trimethoxystyren	P49 E1	194,23	pflanzlich	n.b.	-
Asymm.-Carbonato-diimidazol-elaiophylin	P50 G8	1239,43	Naturstoffderivat	0,6	+
Quercinsäure	P51 A4	486,74	mikrobiell	0,7	-
Niphimycin	P51 A9	1142,49	mikrobiell	1,1	+
Perifurosid D1	P52 B4	694,82	pflanzlich	n.b.	-
Nigranoinsäure	P52 C5	470,7	pflanzlich	n.b.	+
Leontin	P 52 E1	248,37	pflanzlich	n.b.	+
4-Carboxy-2,2'-spriobi[5,6,7,8-tetrahydro-benzo[f]indan]	P52 F3	372,51	Syntheseprodukt	n.b.	-
Neobavaisoflavon	P52 F5	322,36	pflanzlich	n.b.	+
Aridanin	P 52 G2	659,91	pflanzlich	n.b.	+
Tyrocidin	P53 A4	1270,51	mikrobiell	1,3	+
Gramicidin S	P53 B2	1127,45	mikrobiell	n.b.	+
Alamethicin	P53 C1	1964,35	mikrobiell	n.b.	+
3- β -O- α -D-rhamnopyranosyl-(2-1)glucopyranosyl-24-hydroxy oleanolsäure	P53 C5	781	pflanzlich	3,2	+
Elaiophylin-tetrolid	P53 F7	1029,32	Naturstoffderivat	n.b.	+
Oasomycin B-1-N-(2-aminoethyl)-morpholin-amid	P53 G3	1325,69	Naturstoffderivat	n.b.	-
Oasomycin B-1-N-ethylendiamin-amid	P53 G5	1249,6	Naturstoffderivat	n.b.	+
Polygodial	P54 D1	234,34	pflanzlich	n.b.	+
(2S,4aR,6S,8aS)-Methoxy-2-phenyl-tetrahydro-benzo[1,3]dioxin-8-on	P56 A7	264,28	Syntheseprodukt	n.b.	-
(Z)-3-Dimethylamino-1-furan-2-yl-propenon	P56 B1	165,19	Syntheseprodukt	n.b.	-
J-Z	P56 H2	390,35	pflanzlich	n.b.	+
2,3,4,5,2',3',4',5'-Octahydro-11,11'-dimethoxyelaiophylin	P56 H10	1061,41	Naturstoffderivat	n.b.	+
(R,R)-Bis{2-[1-(methylamino)ethyl]phenyl}diselenid	P57 A12	426,33	Syntheseprodukt	n.b.	+
Elasnin	P58 A8	392,58	mikrobiell	n.b.	-
Ginsenoside Rd	P58 D12	947,18	pflanzlich	n.b.	-
unbekannt	P59 A1	488,71	pflanzlich	n.b.	+
8-Prenylnaringenin	P59 G8	340,38	pflanzlich	n.b.	+

3.4.2 Direkter Nachweis der Aptamer-verdrängenden Substanz auf der trypanosomalen Oberfläche

Ziel der vorangegangenen kompetitiven Zellbindungsexperimenten war es, Substanzen zu isolieren, die mit möglichst hoher Affinität und Spezifität an die selbe Bindestelle binden wie das zur Detektion verwendete Aptamer 2-16. Es konnten in diesen Analysen zwei Substanzen isoliert werden, die die Bindung von Aptamer 2-16 an die trypanosomale Oberfläche herabsetzen. Es wurde jedoch bis zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt, ob das Aptamer aus seiner Bindestelle verdrängt wurde weil die betreffende Substanz an die selbe Bindestelle band, oder ob andere Bindungsereignisse diesen Effekt erzeugten, wie z. B. die Bindung der Substanz an das Aptamer selbst. Aus diesem Grund war es notwendig eine Strategie zu entwickeln, anhand derer die kompetierende Substanz direkt detektiert werden konnte. Da dies durch chemische Modifikation erfolgen sollte, wurde nur eine der beiden positiv getesteten Substanzen verwendet. Der Grund hierfür war die Tatsache, dass nur von einer der Substanzen, der Quercinsäure, die Struktur bekannt war. Die Modifikation erfolgte durch die kovalente Verknüpfung der Substanz mit dem Biotinylierungsreagenz Pentylamin-Biotin (Abbildung 37A). Dazu wurde die Carboxylgruppe der Quercinsäure durch EDC aktiviert. Das entstehende instabile O-Acylisoharnstoff-Derivat wurde dann mit der primären Aminogruppe des Pentylamin-Biotins verknüpft, wobei eine stabile Amidbindung ausgebildet wurde (Abbildung 37B).

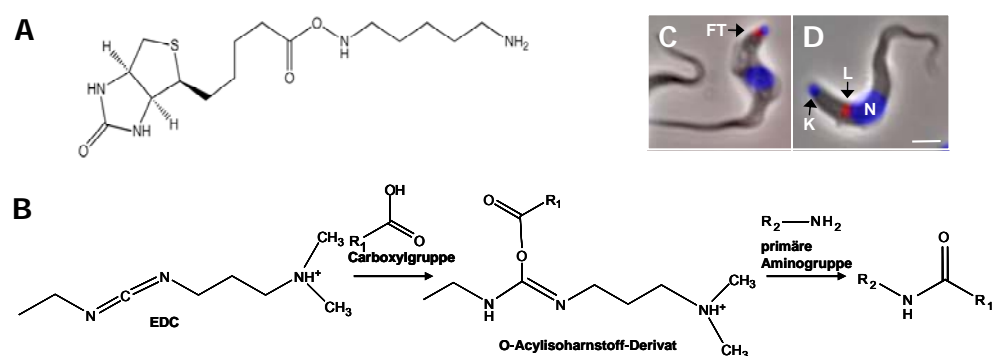


Abbildung 37: Biotin-Modifizierung von Quercinsäure und Detektion der Zellbindung von biotinylierten Quercinsäure. (A) Das Biotinylierungsreagenz Pentylamin-Biotin wurde für die Modifizierung der Quercinsäure eingesetzt. (B) Die Carboxylgruppe der Quercinsäure wurde in einer EDC-medierten Reaktion mit der endständigen Aminogruppe des Pentylamin-Biotin verknüpft. (C) Biotin-modifizierte Quercinsäure konnte mit Hilfe eines Cy3-konjugierten α -Biotin-Antikörpers in der flagellaren Tasche von Blutstrom-Trypanosomen detektiert werden (rot). (D) Unter vitalen Bedingungen wird biotinylierte Quercinsäure durch die Zellen aufgenommen und kann im Lysosom detektiert werden (rot). Nukleäre und Kinetoplasten-DNA wurde mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). FT: flagellare Tasche; L: Lysosom; K: Kinetoplast; N: Nukleus. Skalierungsbalken: 5 μ m.

Der Reaktionsansatz bestehend aus Quercinsäure, EDC und Pentylamin-Biotin in MES pH 5 wurde ohne Reinigung der modifizierten Säure von den anderen Reaktionskomponenten mit lebenden Blutstrom-Trypanosomenzellen inkubiert. Ungebundene Komponenten wurden durch Waschen entfernt und gebundene Biotin-Einheiten durch einen Cy3-markierten α -Biotin-Antikörper detektiert. Es zeigte sich hier bei einem Großteil der Zellen ein punktförmiges Signal, das in der flagellaren Tasche lokalisiert werden konnte (Abbildung 37C). Zur Kontrolle ob dieses Signal auf der unspezifischen Bindung des Pentylamin-Biotins beruht, wurden Trypanosomenzellen mit Reaktionsansätzen inkubiert die nur das freie Biotinylierungsreagenz in Anwesenheit oder Abwesenheit von EDC enthielten. Die Zellen, die mit diesen Kontrollansätzen inkubiert wurden zeigten keine Fluoreszenz, es handelte sich bei dem Signal demnach weder um unspezifische Bindung des Pentylamin-Biotin, noch um Oberflächenbiotinylierung der Trypanosomenzellen aufgrund im Ansatz verbliebener freier Reaktionspartner. Demnach band Quercinsäure an eine Bindestelle, die räumlich an derselben Stelle wie der 2-16 Bindepartner lokalisiert werden konnte.

Es konnte unter diesen Bedingungen kein Fluoreszenzsignal im Zellinneren detektiert werden, demnach konnte die biotinylierte Quercinsäure nicht wie das 2-16 Aptamer von die Zellen aufgenommen werden. Allerdings zeigten die Zellen, die in EDC-haltigen Ansätzen inkubiert wurden eine reduzierte Mobilität, während der Kontrollansatz, der kein EDC enthielt keine sichtbaren Auswirkungen auf den Zustand der Zellen aufwies. Da EDC im wässrigen Medium einer raschen Hydrolyse unterliegt (Lei *et al.*, 2002) schien entweder das Hydrolyseprodukt EDU (N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)urea) oder ein anderes Reaktionsprodukt einen beeinträchtigenden Effekt auf die Zellen auszuüben. Es konnte an dieser Stelle angenommen werden, dass auch andere zelluläre Prozesse wie z.B. endo- und exocytotische Vorgänge durch diese Reaktionskomponenten beeinträchtigt wurden. Die fehlende Aufnahme der biotinylierten Quercinsäure war somit nicht zwangsläufig auf die Bindeeigenschaften der Säure zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde die Bindung mit unterschiedlichen Verdünnungen des Reaktionsansatzes durchgeführt. Es zeigte sich, dass bereits eine Reduktion der Konzentrationen um den Faktor 10 ausreichte um eine annähernd unbeeinträchtigte Mobilität der Zellen zu erreichen. In diesen Zellen war nun ein prominentes Fluoreszenzsignal innerhalb der Zellen sichtbar, das dem endozytotischen System zugeordnet werden konnte (Abbildung 37D). Anhand dieser Ergebnisse kann festgestellt werden, dass Quercinsäure ebenfalls über den endozytotischen Weg in die Zellen aufgenommen wurde wie das Aptamer 2-16 und somit an die selbe Bindestelle bindet wie das Aptamer.

4 Diskussion

Die SELEX-Technologie erlaubt die Selektion von Nukleinsäuren mit spezifischen Eigenschaften, welche anhand des angelegten Selektionsdrucks systematisch entwickelt werden können. Es kann jedoch notwendig sein, den selektionierten Molekülen zusätzliche Charakteristika zu verleihen, die für den Einsatz als biologisch aktive Substanz von Vorteil sind. Werden Moleküle selektioniert, die als Therapeutika eingesetzt werden sollen, so gelten für diese dieselben Anforderungen wie für andere pharmakologisch aktive Moleküle. So ist zum Beispiel je nach Verabreichungsform die Stabilität in Körperflüssigkeiten wie Speichel, Verdauungssäften und Blut ein entscheidendes Kriterium. Für die anti-trypanosomale Therapie bedeutet dies, dass die Stabilität der Therapeutika insbesondere im Blut gegeben sein muss, da die Therapie in frühen Stadien der Krankheit auf die Eindämmung der Parasitämie im Blut des befallenen Wirtes fokussiert ist.

Ein Ziel der hier beschriebenen Experimente war es, das Trypanosomen-spezifische RNA-Aptamer 2-16 von einer lediglich *in vitro* bindenden Substanz in ein therapeutisch aktives und applizierbares Molekül zu konvertieren. Die Anforderungen hierbei waren, die Serumstabilität und generell die Verweildauer des Aptamers im menschlichen Körper zu erhöhen, sowie dem Aptamer neben seinen Bindeeigenschaften auch therapeutische Aktivität zu verleihen.

Zusätzlich sollte das Aptamer 2-16 mit Hilfe von Verdrängungsexperimenten zur Isolierung von Trypanosomen-bindenden Substanzen genutzt werden. Diese sollten im Idealfall eine ähnliche Affinität und Spezifität wie das Aptamer besitzen und das Aptamer in der anti-trypanosomalen Therapie substituieren.

4.1 Die direkte Nutzung von Aptamer 2-16 als therapeutisch aktives Molekül

4.1.1 Die Erhöhung der Serumstabilität von Aptamer 2-16 durch Ribosemodifikationen

Ein direkter Weg zur Generierung Serum-stabiler Aptamere ist es, bereits die Selektion mit Serum-stabilen RNA-Bibliotheken durchzuführen (Brody und Gold, 2000). Hierbei werden verschiedene Strategien verfolgt, um die Stabilität der Nukleinsäurebibliotheken zu erhöhen, wobei meist Modifikationen des Ribosephosphat-Rückgrats gewählt werden, um die Basenpaarung nicht zu beeinträchtigen. Dies kann durch Modifikation sowohl der Phosphodiesterbindung als auch der Riboseeinheit geschehen (zusammengefasst in Micklefield, 2001). Üblicherweise besteht die Modifikation jedoch in der Substitution der 2'-

Hydroxylgruppe durch Gruppen, welche die chemische und enzymatische Hydrolyse des Phosphatrückgrats nicht unterstützen, wie 2'-OMe-, 2'-F- oder 2'-NH₂-Gruppen (Eaton und Pieken, 1995; Jellinek *et al.*, 1995; Ulrich, 2005). Methodisch gesehen bedeutet dies, dass die RNA-Bibliotheken in allen Selektionsschritten in Gegenwart von 2'-substituierten Nukleosidtriphosphaten transkribiert werden, wobei üblicherweise ausschließlich die Pyrimidinnukleosidtriphosphate modifiziert eingesetzt werden.

Es ist jedoch durchaus möglich, Aptamere auch nach dem Selektionsprozess zu modifizieren, vorausgesetzt Struktur und Funktion bleiben von den Modifikationen unbeeinträchtigt. Dieser Ansatz wurde in den hier beschriebenen Experimenten verfolgt (siehe Abschnitt 3.1) Aptamer 2-16 wurde durch den ko-transkriptionellen Einbau von 2'-F- und 2'-NH₂-substituierten Pyrimidinnukleosidtriphosphaten modifiziert. Hierbei wurden alle möglichen Kombinationen von mono- und disubstituierten Aptamer-Varianten erzeugt. Die Analyse der Serumstabilität (siehe Abschnitt 3.1.1) zeigte, dass bereits die Einführung von nur einem modifizierten Nukleotid bei einem Modifizierungsgrad von 21 bzw. 27 % zu führte, dass die Halbwertszeit der RNA auf das 60-fache von ≤ 1 s auf ≤ 1 min anstieg. Die Modifikation von beiden Pyrimidinnukleosiden zeigte bei einer Modifikationsrate von 48 % einen noch viel drastischeren Effekt. Hier konnte die Serumstabilität auf Halbwertszeiten von bis zu mehreren Tagen gesteigert werden. Dabei waren gemischt-modifizierte RNA Varianten die instabilste Population, während diejenigen der disubstituierten RNA-Varianten, die nur eine Modifikationsart enthielten wesentlich stabiler waren. Die stabilste RNA die auf diese Weise generiert werden konnte, war mit 2'-NH₂-dC/dU-substituiert.

Wie diese Ergebnisse verdeutlichen, ist es für die Erhöhung der Serumstabilität einer RNA nicht notwendig, diese ausschließlich unter der Verwendung von modifizierten Nukleotiden herzustellen, was sich unter anderem positiv auf die Synthesekosten auswirkt. Es zeigte sich, dass bereits die Inkorporierung von zwei substituierten Nukleosidtriphosphaten während der Synthese einen zufriedenstellenden Effekt auf die Halbwertszeit ausübt, vor allem dann, wenn ausschließlich Modifikationen desselben Typs verwendet wurden.

Offenbar wird die Geschwindigkeit der hydrolytischen Reaktion durch die fehlende Zugänglichkeit von 48 % der Schnittstellen wesentlich beeinflusst, wobei zusätzlich ein Unterschied in der Zugänglichkeit der Schnittstellen zwischen 2'-F- und 2'-NH₂-substituierten RNA-Molekülen auffiel. Dieser nicht unerhebliche Effekt deutet auf ein kooperatives Zusammenspiel von endo- und exonukleolytischen Vorgängen in der Degradation der RNA durch Serum-eigene RNasen hin. Wie anhand der Diskriminierung zwischen verschiedenen Modifikationsarten ersichtlich, hängt dieser Prozess nicht nur von der Zugänglichkeit von 2'-Hydroxylgruppen ab, sondern wird auch durch 2'-Substitutionen vermittelte strukturelle Eigenschaften der RNA beeinflusst.

4.1.2 Der Einfluss von 2'-Modifikationen auf Struktur und Funktion von Aptamer 2-16

Die Modifikation des Aptamers erfolgte durch den Einbau von 2'-substituierten Nukleosidtriphosphaten, da Modifikationen der Ribose die Basenpaarung nicht beeinflussen und so die Struktur des Aptamers möglichst wenig verändert werden soll. Dies ist nicht selbstverständlich der Fall, da die 2'-Hydroxylgruppe einen wesentlichen Beitrag zur strukturellen Organisation des RNA-Moleküls leistet (Saenger, 1984). Aptamer 2-16 wurde ursprünglich als unmodifiziertes Aptamer selektioniert. Daher erforderte die post-SELEX-Modifikation durch die Einführung von 2'-Substitutionen eine detaillierte Analyse der funktionellen und strukturellen Konsequenzen die sich aus diesen Modifikationen ergeben. Die Modifikationen von Aptamer 2-16 zeigten unterschiedliche Effekte auf die Funktion des Aptamers (siehe Abschnitt 3.1.2.1). Reine 2'-NH₂-Substitutionen führten zu einem kompletten Funktionsverlust des Aptamers. Aptamere die gleichzeitig mit 2'-F- und 2'-NH₂-substituierten Nukleotiden modifiziert wurden, zeigten hingegen zwar immer noch Bindung, diese war aber aufgrund fehlender Kompetierbarkeit eher unspezifischen Bindeereignissen zuzuordnen. Einzig die 2-16 RNA-Variante, die beide 2'-F-substituierten Pyrimidinnukleoside enthielt zeigte noch Bindeaktivität, die mit der des unmodifizierten Aptamers vergleichbar war. Die Analyse der Bindungscharakteristika zeigte einen schwachen Einfluss der Substitutionen auf die Affinität des Aptamers (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Die 2'-F-dC/dU-modifizierte RNA wies einen K_d von 45 nM bei $\leq 10^4$ Bindestellen pro Zelle auf, diese Werte lagen jedoch immer noch in der in derselben Größenordnung wie die des unmodifizierten Aptamers (K_d=10 nM, $1-2 \cdot 10^4$ /Zelle). Die leichte Verschlechterung der Affinität war nicht unerwartet, da ähnliche Beobachtungen für andere post-SELEX modifizierte Aptamere (Pan *et al.* 1995) sowie für 2'-F-modifizierte siRNAs gemacht werden konnten (Layzer *et al.*, 2004).

Zusätzlich zu den quantitativen Analysen der Bindecharakteristika wurde das Bindeverhalten des 2'-F-dC/dU-modifizierten Aptamers im Vergleich zur unmodifizierten RNA visualisiert. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Bindung der beiden Aptamer-Varianten an lebende Blutstrom-Trypanosomenzellen. Es konnte in beiden Fällen die Bindung an die flagellare Tasche sowie die endozytotische Aufnahme der RNA festgestellt werden, wobei keine weiteren Bindestellen detektiert werden konnten. Die 2'-F-dC/dU-Modifikation hatte demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Bindestelle und den Aufnahmevergange des Aptamers.

Das modifikationsspezifische Bindeverhalten der substituierten RNA-Varianten kann anhand des Einflusses der 2'-Modifikationen auf die Struktur der RNA erklärt werden. Insbesondere die Konformation der Ribose wird durch die Art der 2'-Substitution beeinflusst (Olson und Sussmann, 1982; Olson, 1982). RNA-Helices liegen bevorzugt in der A-Form vor, die durch die C3'-Endo-Konformation

der Ribose determiniert wird. Heteroatom-Modifikationen wie 2'-NH₂-Gruppen fördern allerdings die C2'-Endo-Konformation, die ein Hauptcharakteristikum der B-Form Helix wie im Fall der DNA darstellt. Im Gegensatz hierzu favorisieren Oligonukleotide, welche 2'-OMe- oder 2'-F-Modifikationen tragen die „RNA-Konformation“ C3'-Endo. Die Konformation der Ribose wird durch die Elektronegativität des 2'-Substituenten determiniert (Guschlbauer und Jankowsky, 1980). Demnach ist der hier beschriebene Effekt auf die höheren Elektronegativitäten des Fluor-Atoms bzw. der O-Methyl- oder Hydroxylgruppe zurückzuführen, die diese im Vergleich zu der Aminogruppe oder dem Wasserstoff an der 2'-Position der Desoxyribose besitzen.

Dieser Effekt kann bereits auf der Ebene des Mononukleotids beobachtet werden: Für Ribonukleotide kann ein Gleichgewichtsverteilung in der Konformation von 60 % C3'-Endo gegenüber 40 % C2'-Endo beobachtet werden. Das umgekehrte Verhältnis stellt sich ein, wenn die Ribose weniger elektronegative Substituenten an der 2'-Position besitzt. Die Einführung von Fluor, dem Element mit der höchsten Elektronegativität, verschiebt das Konformationsverhältnis hin zu einer fast 100 % reinen C3'-Endo-Konformation (Guschlbauer *et al.*, 1977; Suck *et al.*, 1974). Die bedeutet für die Modifikation eines RNA-Aptamers, dass weniger elektronegative 2'-Substitutionen wie z. B. 2'-NH₂-Gruppen die Konformation der RNA insbesondere in hoch-strukturierten, helikalen Regionen destabilisieren, was die Funktion dieser RNA-Varianten erheblich beeinträchtigen kann. 2'-Substituenten mit höherer Elektronegativität wie 2'-F-Modifikationen verstärken die Konformation der strukturell organisierten RNA besonders in doppelsträngigen, helikalen Bereichen und sollten deshalb die Funktion wenn überhaupt nur wenig beeinflussen.

Da es sich bei Aptamer 2-16 um ein strukturell hochorganisiertes, überwiegend helikales RNA-Molekül handelt, kann angenommen werden, dass insbesondere die helikalen Bereiche in die Interaktion des Aptamers mit der trypanosomalen Oberfläche kontributieren. Demnach üben 2'-F-Modifikationen einen Struktur- und Funktions-konservierenden Einfluss auf die RNA aus, während 2'-NH₂-Substitutionen Struktur und damit auch die Funktion des Aptamers beeinträchtigen sollte. Diese Hypothese wurde anhand der Bindeeigenschaften der modifizierten RNA-Varianten bestätigt.

Der strukturelle Einfluss der 2'-F-Substitutionen wurde im Detail untersucht, indem die RNA Struktur-spezifischer enzymatischer und chemischer Hydrolyse unterzogen wurde. Hierbei zeigte sich dass die Struktur der 2'-F-dC/dU-modifizierten RNA ähnliche Hydrolysemuster erlaubte wie die unmodifizierte RNA. Demnach hatten die Modifikationen in diesem Fall wie erwartet keine drastischen strukturellen Veränderungen in der Struktur hervorgerufen. Allerdings zeigte sich, dass insbesondere die Pseudoknotenregion sowie die einzelstrangnahen, helikalen Bereiche besser zugänglich für enzymatische und chemische Spaltung

waren, was für eine Fluktuation der Struktur, ein sogenanntes „breathing“ der Helix Enden in diesen Bereichen spricht.

Pseudoknoten sind helikale Bereiche, die üblicherweise zwischen der Schleife einer Haarnadelstruktur und einer einzelsträngigen Region ausgebildet werden. Es wurden bereits Untersuchungen zur Struktur von Pseudoknoten-Regionen durchgeführt (Pleij *et al.*, 1985; Puglisi *et al.*, 1990; Hilbers; 1998, Egli *et al.*, 2003), jedoch basieren diese fast ausnahmslos auf einem speziellen Pseudoknoten-Typ, der als H-Form bezeichnet wird. Der H-Form-Pseudoknoten leitet sich von der Struktur der tRNA-ähnlichen *Turnip Yellow Mosaic Virus* RNA ab (Rietveld, 1982), und besteht aus zwei helikalen Regionen, die von zwei sich kreuzenden Schleifen gebildet werden und durch Basenstapelung eine koaxiale Helix formen. Es wurde gezeigt, dass die Nukleotide innerhalb der koaxialen Helix in der C3'-endo-Konformation vorliegen, und der H-Form-Pseudoknoten demnach eine A-Helix ausbildet. Da die Pseudoknotenregion des Aptamers 2-16 nur aus einem helikalen Bereich besteht, der von einzelsträngigen Regionen flankiert wird, kann das Strukturmodell des H-Form-Pseudoknotens nicht auf das Aptamer übertragen werden. Vielmehr deutet die Destabilisierung der Pseudoknoten-Region als Folge der 2'-Modifikation darauf hin, dass die Basenpaare innerhalb der Pseudoknotenregion keine A-Form Helix ausbilden, weshalb dieses strukturelle Element durch die Einführung der 2'-F-Modifikationen nicht stabilisiert wird.

Die aus der Einführung von 2'-Modifikationen resultierende generell erhöhte Dynamik der Struktur, insbesondere an den Enden der helikalen Bereiche, kann im Detail nicht erklärt werden. Die Einführung von 2'-Fluor-Substitutionen sollte die A-Form der RNA-Helices stabilisieren, weshalb die erhöhte strukturelle Dynamik zunächst kontrovers erscheint. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass RNA-Moleküle, die in der A-Form vorliegen generell eine größere Tendenz zum sogenannten „breathing“, d.h. zum reversiblen Öffnen von Basenpaaren aufweisen als Nukleinsäuren, die andere helikale Konformationen einnehmen (Pan und MacKerell, 2003). Die A-Form führt zu einer erhöhten Rigidität der Struktur, was durch die Flexibilität der Ribosekonformation sowie dem Torsionswinkel χ , und damit der Konformation der glykosidischen Bindung determiniert wird. Es konnte anhand von Kristallstrukturen gezeigt werden, dass für Nukleinsäuren der A-Form die Flexibilität dieser Bereiche stark eingeschränkt ist, im Vergleich zu beispielsweise der B-Form DNA (Foloppe und MacKerell, 1999). Hinzu kommt, dass in RNA-Molekülen die 2'-OH-Gruppe eine Wasserstoffbrücke mit dem 4'-O des 3'-benachbarten Nukleotids bilden kann. Die Bildung der Wasserstoffbrücke ist jedoch aufgrund der eingeschränkten Flexibilität der A-Form nur bei einem Öffnen der Basenpaarung der entsprechenden Nukleotids möglich. Somit führt die erhöhte Rigidität der Struktur zu einem molekularen „switch“, der zur temporären Öffnung von Basenpaaren in helikalen Bereichen der RNA führt. 2'-Fluor-Modifikationen verschieben

das Gleichgewicht in der Konformation einer RNA-Helix hin zur A-Form und Stabilisieren die Rigidität der Struktur. Es steht hier allerdings keine 2'-Hydroxylgruppe zur Ausbildung der Wasserstoffbrücke mit dem 4'-O des nachfolgenden Moleküls zur Verfügung. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Fluor aufgrund seiner hohen Elektronegativität als schwacher Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren kann (Murray-Rust *et al.*, 1983; Karipides und Miller, 1984). Dies könnte die Basis für die Ausbildung des molekularen „switch“ in der Struktur der 2'-modifizierten RNA darstellen, was in Kombination mit der erhöhten Rigidität der Struktur die temporäre Öffnung der Basenpaare im Vergleich zur unmodifizierten RNA verstärken würde.

In einer anderen Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die molekulare Dynamik einer RNA-Struktur durch Modifikationen erhöht werden kann. Es wurden Strukturuntersuchungen mit einem artifiziellen RNA-Duplex durchgeführt, der mit einem 2,4-Difluorophenyl-substituierten Nukleotidanalogen modifiziert wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Modifikation die A-Form des RNA-Duplex verstärkte, jedoch die Fluktuation der Struktur erhöhte. Dies war in diesem Fall auf die direkte Beeinflussung der Modifikation auf die Torsionswinkel ϵ und ξ des modifizierten Nukleotids sowie auch der benachbarten Nukleotide zurückzuführen (Zacharias und Engels, 2004). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die 2'-F-dC/dU-Modifikation neben der C3'-Konformation auch andere strukturelle Parameter der RNA beeinflusst und damit Fluktuationen in der Struktur des Moleküls erhöht.

Die Konformation der Ribose beeinflusst erheblich die thermische Stabilität von Nukleinsäuren. Die Analyse der Thermostabilität des 2'-F-dC/dU-modifizierten Aptamers im Vergleich zur unmodifizierten RNA bestätigte dies. Der Schmelzpunkt der modifizierten RNA war im Vergleich zu dem des unmodifizierten Aptamers stark erhöht und nur in Abwesenheit von stabilisierenden monovalenten und bivalenten Kationen überhaupt messbar. Es ist bekannt, dass 2'-Modifikationen mit Substituenten die eine hohe Elektronegativität aufweisen, wie z.B. 2'-F, einen stabilisierenden Effekt auf DNA- wie RNA-Moleküle ausüben. Dies wird mit dem stabilisierenden Effekt der 2'-F-Substitution auf die A-Form der RNA-Helices begründet (Kawasaki *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu setzen 2'-Substituenten mit niedriger Elektronegativität wie 2'-NH₂ die Thermostabilität von Nukleinsäuren generell herab (Aurup 1994). Zusätzlich kann das Fluor-Atom aufgrund seiner hohen Elektronegativität als schwacher Wasserstoffbrückenakzeptor dienen (Murray-Rust *et al.*, 1983; Karipides & Miller, 1984), was zur zusätzlichen Interaktion mit dem umgebenden wässrigen Medium führt und damit die Stabilisierung der RNA-Struktur verstärkt (Lesnik *et al.*, 1993).

Die Erhöhung des Schmelzpunktes (T_m) der 2'-F-substituierten RNA um 0,5°C pro modifizierter Position geht einher mit einer Veränderung der freien Energie um -25,7 kJ/mol. Damit wird zum Aufschmelzen des 2'-F-dC/dU-substituierten

Aptamers erheblich mehr Energie benötigt, obwohl wie aus den Strukturdaten ersichtlich offenbar mit der Pseudoknotenregion eines der strukturellen Elemente destabilisiert wurde. Zudem wurden die Untersuchungen zur thermischen Stabilität der 2'-F-modifizierten RNA im Gegensatz zu den Analysen der unmodifizierten RNA in Abwesenheit von monovalenten und divalenten Kationen durchgeführt, die die RNA-Struktur aufgrund ihrer Ladungs-maskierenden Eigenschaften zusätzlich stabilisieren. Es kann daher angenommen werden, dass der tatsächliche Unterschied in T_m und freier Energie der beiden RNA-Varianten erheblich größer ist als er unter diesen Bedingungen gemessen werden konnte.

Aufgrund der hier diskutierten Ergebnisse kann festgestellt werden, dass bei der post-SELEX-Modifikation von strukturell hochorganisierten RNA-Aptameren stark elektronegative Substituenten wie 2'-F oder 2'-OMe den weniger elektronegativen 2'-Substituenten wie 2'-NH₂ oder 2'-H vorgezogen werden sollten. Damit sollten Konformationsänderungen der Ribose und der Funktionsverlust des Aptamers vermieden werden. Die Einführung von 2'-NH₂-Substitutionen führt zwar zu einer erheblich höheren Halbwertszeit der RNA als die Modifikation durch 2'-F-substituierte Nukleotide, jedoch sind solche extrem hohen Halbwertszeiten aus pharmakokinetischer Sicht nicht erwünscht, da im Fall von Nebenwirkungen dies die schnelle Entfernung der Substanz aus dem System verzögern würde. Zusätzlich wird durch die 2'-F-Substitutionen die thermische Stabilität der RNA erheblich erhöht, d.h. dass Sekundärstrukturelemente der RNA und damit auch die aktive Konformation des Aptamers stabilisiert werden.

4.1.3 Die Modifikation von Aptamer 2-16 durch PEG-Derivate

Die Halbwertszeit eines Therapeutikums muss an dessen Applikation angepasst werden. Im Fall von lokaler Verabreichung erreicht die Substanz sofort ihren Einsatzort und kann dort ihre therapeutische Wirkung entfalten. Die systemische Applikation hingegen führt zunächst zur Verteilung des Wirkstoffs im Körper und erfordert die Anreicherung der Substanz am Wirkungsort. In beiden Fällen muss gewährleistet sein, dass die therapeutische Wirkung der Substanz nicht durch Degradation oder die frühzeitige Ausscheidung aus dem Körper inhibiert wird, wobei dies insbesondere bei der systemischen Applikation eine kritische pharmakokinetische Eigenschaft des Wirkstoffs darstellt.

Die Verweildauer eines Aptamers im Körper hängt somit nicht allein von dessen Stabilität im Serum, sondern auch von der Ausscheidungsrate ab. Kleine Moleküle wie Aptamere werden üblicherweise innerhalb weniger Minuten nach intravenöser Injektion aus dem Plasma entfernt, wobei dies hauptsächlich über den Urinaltrakt geschieht. Die Ausscheidungsrate von RNA-Aptameren korreliert invers mit deren Molekulargewicht, weshalb ein Ansatz zur Verlängerung der Aufenthaltsdauer im Körper die Erhöhung der molekularen Masse darstellt.

Hierfür existieren verschiedene Strategien wie z.B. die Modifizierung der RNA mit einem Biotin/Streptavidin-System (Dougan *et al.*, 2000) oder die Einbettung der RNA in Liposomen (Willis *et al.*, 1998). In den meisten Fällen wird die RNA jedoch mit Polyethylenglycol (PEG) verknüpft (Ruckman *et al.*, 1998, Floege *et al.*, 1999, Brody und Gold, 2000), einem chemisch inerten, hydrophilen Polymer, das aufgrund seiner geringen Immunogenität zur Modifikation von intravenös applizierten Substanzen bestens geeignet ist.

Aptamer 2-16 wurde mit 3 verschiedenen PEG-Derivaten mit molekularen Massen von 5, 10 und 20 kDa (mPEG₅₀₀₀, mPEG₁₀₀₀₀, mPEG₂₀₀₀₀) verknüpft, und die daraus resultierenden Konjugate wurden auf ihre Bindeaffinität getestet. Es zeigte sich, dass die Affinität der konjugierten Aptamer-Varianten gegenüber der Bindung lebender Trypanosomenzellen mit steigender PEG-Größe abnahm. Die Verknüpfung mit mPEG₅₀₀₀ zeigte noch keinen Effekt auf die Bindung, hier lag der K_d wie auch im Fall der unmodifizierten RNA bei 10 nM. Die Verknüpfung mit einem mPEG₁₀₀₀₀ verschlechterte die Affinität auf einen K_d von 75 nM, während die Erhöhung der molekularen Masse mit mPEG₂₀₀₀₀ die Affinität um eine weitere Größenordnung auf einen K_d von 770 nM verschlechterte. Es konnte bereits in anderen Fällen beobachtet werden, dass die Modifikation durch PEG die Funktion eines Aptamers beeinträchtigt, jedoch liegt die Beeinträchtigung oft in einem vertretbaren Rahmen (Ruckman, 1998).

Aptamere, die extrazelluläre Zielmoleküle binden sollen, werden üblicherweise gegen leicht zugängliche Strukturen selektioniert (vgl. Pestourie *et al.*, 2005). In

dem hier vorgestellten Fall wurde Aptamer 2-16 gegen invariante Oberflächenproteine von Trypanosomen selektioniert, die aufgrund der spezialisierten Oberfläche der Parasiten sterisch gegen die Bindung durch zellfremde Substanzen abgeschirmt sind. Diese Abschirmung der Oberfläche kann jedoch von Molekülen mit geringem Molekulargewicht wie z. B. RNA-Aptameren überwunden werden. Basierend auf der beschränkten Zugänglichkeit der Zielstruktur könnte die größenabhängige Erhöhung der Dissoziationskonstante nicht auf der tatsächlichen Verschlechterung der Bindeeigenschaften des modifizierten Aptamers, sondern auf der schlechteren Zugänglichkeit des Zielmoleküls beruhen.

Es konnte jedoch durch die Verknüpfung mit mPEG₁₀₀₀₀ ein Aptamer-Konjugat generiert werden, dass mit einer weiterhin akzeptablen Affinität an die trypanosomale Oberfläche bindet. Die Bindung wurde nur um den Faktor 7,5 verschlechtert, dies liegt in einem Bereich, der auch für andere Aptamer~PEG-Konjugate beobachtet wurde (Ruckmann *et al.*, 1998). Die Modifikation mit mPEG₁₀₀₀₀ führt zu einem Konjugat mit einer molekularen Masse von ca. 35 kDa. Es konnte im Ratten-Modell gezeigt werden, dass Aptamer~PEG-Konjugate mit ähnlicher Größe eine signifikant erhöhte Verweildauer im Körper aufweisen als das korrespondierende unmodifizierte Aptamer (Healy *et al.*, 2004). Offensichtlich liegt diese Größe über dem maximalen Schwellenwert für die Größe, die im Glomerulus aufgenommen und zur Ausscheidung vorbereitet werden kann.

Es ist demnach zu erwarten, dass das 2-16~mPEG₁₀₀₀₀-Konjugat im Vergleich zum unmodifizierten Aptamer eine verlängerte Verweildauer im Körper aufweist, dies muss jedoch in zukünftigen Experimenten überprüft werden. Im Weiteren muss getestet werden, inwiefern die Modifikation durch PEG nicht nur die Verweildauer im Körper sondern auch die Verteilung des Aptamer-Konjugats im Gewebe beeinflusst. Frühere Arbeiten beschreiben die signifikante Erhöhung der Verteilung von PEGylierten Aptameren insbesondere in stark durchbluteten Geweben (Healy *et al.*, 2004; Boomer *et al.*, 2005). Da die Anreicherung von Substanzen in Geweben ein Risikofaktor für eventuell auftretende Nebenwirkungen bzw. Organschäden darstellt, könnte hier anhand der Größe der PEG-Einheit diese Eigenschaften moduliert werden, um eine optimale Größe für eine möglichst lange Verweildauer bei möglichst geringer Gewebeverteilung zu erreichen.

4.1.4 Der therapeutische Ansatz – membranaktive Substanzen

Aptamer 2-16 war aus einer Selektion hervorgegangen, in der invariante Proteine auf der Oberfläche von lebenden Blutstrom-Trypanosomen als Zielmoleküle verwendet wurden. Es zeigte sich, dass Aptamer 2-16 an die flagellare Tasche der Parasiten bindet und über den endozytotischen Apparat internalisiert wird, wo es sich im einzigen Lysosom der Zellen anreichert (Homann und Göringer,

1999, 2001). Damit eröffnete sich die Möglichkeit, mit Hilfe des Aptamers, das ursprünglich gegen eine extrazelluläre Zielstruktur selektioniert worden war, intrazelluläre Bereiche als Ziele für therapeutische Ansätze zu erreichen. Insbesondere das Lysosom stellt einen viel versprechenden Kandidaten für therapeutische Ansätze dar, da bereits natürliche und artifizielle Wege der anti-trypanosomalen Therapie existieren, in die das Lysosom involviert ist. *T. brucei brucei* kann im Gegensatz zu den humanpathogenen Stämmen *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense* im menschlichen Serum nicht überleben. Der Grund hierfür besteht in der endozytotischen Aufnahme eines Serum-eigenen Proteins durch die Parasiten, was im Fall von *T. brucei brucei* zum Absterben der Zelle führt (Rifkin, 1978; Hager *et al.*, 1994, Review Pays *et al.*, 2006). Bei diesem Protein handelt es sich um den sogenannten „Trypanosome Lytic Factor“ (TLF), wobei dieser als Apolipoprotein L1 identifiziert werden konnte (Vanhamme *et al.*, 2005). ApoL1 reichert sich im Lysosom der Trypanosomenzellen an, wo es Poren in der lysosomalen Membran ausbildet. Infolge dessen kommt es zum osmotischen Einstrom und damit zur Vergrößerung der Organelle, was das Absterben der Zelle zur Folge hat (Pérez-Morga *et al.*, 2005). Die humanpathogenen Stämme *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense* hingegen besitzen einen natürlichen Resistenzmechanismus, der durch das sogenannte „serum resistance associated protein“ (SRA) vermittelt wird, das die Anreicherung von ApoL1 im Lysosom inhibiert (Oli *et al.*, 2006; Shiflett *et al.*, 2007). Dieser Mechanismus basiert auf der spezifischen Bindung von SRA und ApoL1, weshalb ein Ansatz in der Überwindung dieser Resistenz darauf beruht, diese Interaktion zu inhibieren (Baral *et al.*, 2006).

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Poren-bildenden Eigenschaften von ApoL1 durch artifizielle Moleküle zu imitieren, die durch den Resistenzmechanismus der Zelle nicht erkannt und inaktiviert werden. Hierfür wurden hydrophob-assoziierende Polymere und pH-steuerbare Pseudopeptide, sowie membranaktive Peptide getestet. Diese Moleküle besitzen entweder intrinsische oder durch Modifikationen erzeugte pH-abhängige Eigenschaften, die ihre Eignung als therapeutisch einsetzbare Moleküle fördern. Unter neutralen pH-Bedingungen zeigen sie keine Zytotoxische Aktivität, während unter schwach sauren Bedingungen, wie sie in Endosomen und im Lysosom vorherrschen, eine strukturelle Transition die Poren-bildende Aktivität ermöglicht. Zur Anreicherung dieser Moleküle im Lysosom sollte Aptamer 2-16 genutzt werden, von dem bereits gezeigt werden konnte, dass es dazu in der Lage ist, kovalent verknüpfte Moleküle in das Lysosom der Zelle zu dirigieren (Homann und Göringer, 2001). Die zu testenden Komponenten sollten, falls kommerziell nicht erhältlich, synthetisiert und kovalent mit Aptamer 2-16 verknüpft werden. Die Konjugate sollten dann auf ihre Zytotoxische Aktivität gegenüber Blutstrom-Trypanosomenzellen untersucht werden.

4.1.4.1 Artificielle Polymere und Pseudopeptide - Poly(Lysin Dodecanamid) und Poly(2-Propylacrylsäure)

Das pH-steuerbare Pseudopeptid Poly(Lysin Dodecanamid) (Eccleston *et al.*, 2000) und das hydrophob assoziierende Polymer Poly(2-Propylacrylsäure) (Murthy *et al.*, 1999) wurden synthetisiert. Diese Moleküle besitzen gemeinsame strukturelle Eigenschaften, die ihre pH-abhängige Funktion ermöglichen. Sie bestehen aus sich wiederholenden Monomer-Einheiten, die aus je einem hydrophoben Anteil sowie einem hydrophilen, Carboxylat-enthaltenen Teil bestehen (vgl. Abschnitt 3.3.1, Abbildung 18).

Die Carboxylgruppe ist unter neutralen pH-Bedingungen negativ geladen, was die Löslichkeit im wässrigen Medium fördert. Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Carboxylgruppen bildet sich eine elongierte Struktur, die keine Interaktion mit Membranen eingeht. Beim Absenken des pH-Wertes kommt es zur schrittweisen Protonierung der Carboxylatgruppen, was zur Folge hat, dass der Ionisierungsgrad des Moleküls abnimmt. Im Zuge dessen sinkt ebenfalls die elektrostatische Abstoßung innerhalb des Moleküles. Bei einem für jedes Molekül spezifischen Grad der Ionisierung ist die interne elektrostatische Abstoßung gering genug, dass sie von der Anziehung der hydrophoben Anteile überwunden werden kann. Es kommt zu einer rapiden strukturellen Transition, in der die hydrophoben Bereiche des Moleküls assoziieren, was in der Ausbildung einer sehr dicht gepackten „random coil“-Struktur mit geringer Wasserlöslichkeit resultiert. Diese Entropie-getriebene hydrophobe Assoziation und die damit einhergehende strukturelle Transition von Polymeren wird auch als „hypercoiling“ bezeichnet (Eccleston *et al.*, 2000; Tonge und Tighe, 2001). Der progressive Verlust an Ladung während des strukturellen Übergangs führt zur transienten Ausbildung eines amphiphatischen Moleküls, das mit Membranen interagieren und Poren bilden kann.

Es zeigte sich jedoch, dass die hier hergestellten Poly(Lysin Dodecanamid)-Präparationen nur eine sehr geringe Wasserlöslichkeit aufwiesen. Auch unter stark alkalischen Bedingungen konnte das Polymer kaum in Lösung gebracht werden. Hier kam es anscheinend bereits während der Synthese und nachfolgenden Aufreinigung zur Assoziation der hydrophoben Bereiche, was zur unter wässrigen Bedingungen irreversiblen Ausbildung der Hyperknäuelstruktur führte.

Das Polymer Poly(2-Propylacrylsäure) (PPAS) zeigte eine gute Wasserlöslichkeit und wurde deshalb hinsichtlich seiner pH-abhängigen, membrandisruptierenden Eigenschaften analysiert. Zu diesem Zweck wurden Lyseexperimente mit humanen Erythrozyten durchgeführt. Es zeigte sich, dass PPAS unter neutralen Bedingungen kaum lytische Aktivität aufwies. Eine Verschiebung des pHs in den sauren Bereich erhöhte den membrandisruptierenden Effekt auf die Erythrozyten

jedoch erheblich, was im Einklang mit bereits publizierten Daten steht (Murthy *et al.*, 1999).

Demnach sollte PPAS unter neutralen Bedingungen auch auf andere Zelltypen ebenfalls keinen schädigenden Einfluss ausüben, vorausgesetzt es findet keine Aufnahme durch die betreffende Zelle in saure Kompartimente statt. Dennoch zeigte PPAS unter neutralen pH-Bedingungen eine konzentrationsabhängige Zytotoxische Wirkung auf Blutstrom-Trypanosomen, wobei 50 % der Zellen bei einer Konzentration von 66,5 µg/mL abgetötet wurden, was einer molaren Konzentration im unteren µM Bereich entspricht. Eine 100 % letale Dosis ergab sich bei ca. 200 µg/mL PPAS, also ein Konzentrationsbereich zwischen 3,3 und 11,1 µM. Das bedeutet, dass ca. $2 \cdot 10^9$ Moleküle notwendig sind um eine Trypanosomenzelle abzutöten. Dieser Wert liegt zwei Größenordnungen über der Anzahl an Molekülen, die benötigt wird, um unter schwach sauren Bedingungen eine Erythrozytenzelle zu lysieren. Hierfür wurde eine Zahl von 10^7 Molekülen pro Zelle ermittelt (Murty *et al.*, 1999).

Eine zytotoxische Wirkung, die ohne Aufnahme des Polymers von außen auf die Zelle einwirkt, kann aufgrund der vorherigen Analysen zur pH-Abhängigkeit der lytischen Aktivität ausgeschlossen werden. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte darin bestehen, dass PPAS auf unspezifischen Weg in das Zellinnere gelangt. Da PPAS unter neutralen Bedingungen sehr stark negativ geladen ist, kann der Eintritt in die Zelle mittels Diffusion durch die Plasmamembran der Parasiten ausgeschlossen werden. Der Eintritt findet sehr wahrscheinlich über pinozytotische Vorgänge statt, die in der Lokalisation des Polymers in sauren Kompartimenten wie Endosomen oder Lysosom resultieren. Dort würde aufgrund des schwach sauren pHs die strukturelle Transition stattfinden, die eine Interaktion des Polymers mit den endosomalen bzw. der lysosomalen Membran ermöglicht. Der beobachtete zytotoxische Effekt würde in diesem Fall auf der Disruption der endo- bzw. lysosomalen Membran beruhen. Die Aufnahme des Polymers stellt höchstwahrscheinlich den limitierenden Schritt in der Lyse der Trypanosomenzellen dar, aus diesem Grund wird eine relativ hohe Konzentration des Polymers zur Lyse der Zellen benötigt. Es kann jedoch an dieser Stelle keine Aussage darüber getroffen werden, wie viele Polymermoleküle von einer Trypanosomenzelle aufgenommen werden müssen, damit es zum Zelltod kommt.

Die letale Dosis von PPAS liegt zwei bis drei Größenordnungen über dem K_d von Aptamer 2-16. Es ist anzunehmen, dass die Bindung des Polymers an die trypanosomale Oberfläche eine geringere Affinität aufweist und somit die Aufnahmerate geringer ist als die des Aptamers. Aus diesem Grund sollte die kovalente Verknüpfung von Polymer und Aptamer eine deutliche Senkung der letalen Dosis zur Folge haben. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die Bindung des Aptamers sowie die lytische Aktivität des Polymers von der Verknüpfung nicht signifikant beeinflusst werden.

Es wurden verschiedene Möglichkeiten der Verknüpfung von PPAS und dem Aptamer 2-16 getestet, jedoch konnte in keinem Fall ein Verknüpfungsprodukt erzielt werden. Die Verknüpfungsreaktionen wurden unter schwach basischen pH-Bedingungen durchgeführt. Die Carboxylgruppen des Polymers sollten bei diesem pH-Wert deprotoniert vorliegen und dem Molekül eine starke negative Ladung verleihen. Das Polymer liegt unter diesen Bedingungen in seiner elongierten Konformation vor, es kann also angenommen werden, dass die negativen Ladungen exponiert an der Oberfläche des Moleküls vorliegen. Da die RNA ebenfalls ein polyanionisches Molekül ist, könnte die Verknüpfung aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Moleküle fehlgeschlagen sein. Da jedoch auch variierte Verknüpfungsbedingungen, die auch die Zugabe von Salz zur Ladungsmaskierung einschlossen, nicht zur erfolgreichen Verknüpfung der Moleküle führten, wurde der Ansatz an dieser Stelle verworfen.

Damit wurde die Arbeit an artifiziellen Polymeren als anti-trypanosomale Agenzien beendet. Im Fall von PPAS konnte jedoch wie bereits diskutiert eine zytotoxische Wirkung gezeigt werden, die höchstwahrscheinlich auf die Aufnahme der Substanz zurückgeht. Es bleibt zu klären, ob durch eine alternative Methode die Bindung und Aufnahme des Polymers verbessert und damit die letale Dosis gesenkt werden kann. Eine Möglichkeit wäre die kovalente Verknüpfung des Polymers mit Molekülen, die wie auch das Aptamer 2-16 einer rasche Bindung und Aufnahme in die endozytotischen Kompartimente unterliegen. Es konnte ein Antikörper-Fragment identifiziert werden, ein sogenannter „Nanobody“, der an invariante Regionen von verschiedenen VSG-Varianten bindet (Stijlemans *et al.*, 2004). Das Antikörperfragment kann mit toxischen Komponenten verknüpft werden, die auf diesem Wege an die trypanosomale Oberfläche geleitet werden. Die Oberfläche unterliegt einem konstanten Austausch, indem die VSG-enthaltene Membran über die flagellare Tasche in endosomale Kompartimente endozytiert und wiederverwertet wird. Auf diesem Wege kann das VSG-gebundene Antikörperfragment mitsamt dem daran gebundenen Toxin in die Zelle gelangen und einen zytotoxischen Effekt auf die Zelle ausüben. Für das VSG-bindende Antikörperfragment konnte bereits gezeigt werden, dass das so gesteuerte Einbringen von zytotoxischen Substanzen die konzentrationsabhängige Lyse der Trypanosomen zur Folge hat (Stijlemans *et al.*, 2004; Baral *et al.*, 2006). Eine Verknüpfung dieses Antikörperfragments mit PPAS sollte ebenfalls zur spezifischen Lyse der Zelle führen. Da es sich bei dem Polymer um ein artifizielles Molekül handelt, sollte die Zelle der zytotoxischen Wirkung keinerlei Resistenzmechanismen entgegensetzen können.

4.1.4.2 Die Verknüpfung von Aptamer 2-16 mit Melittin

Die ersten Experimente zur Verknüpfung von zytotoxischen Polymeren mit Aptamer 2-16 scheiterten entweder an der schlechten Löslichkeit oder sehr

wahrscheinlich an der elektrostatischen Abstoßung der beteiligten polyanionischen Moleküle. Aus diesem Grund wurde im Weiteren ein gut lösliches, kationisches und natürlich-vorkommendes Peptid gewählt. Melittin besteht aus 26 Aminosäuren und besitzt amphiphatischen Charakteristika. Während die 20 NH₂-terminalen Aminosäuren fast alle ungeladen bzw. unpolar sind, befinden sich unter den sechs C-terminalen Aminosäuren vier positiv geladene. Melittin war in der Vergangenheit bereits Gegenstand vieler Studien und stellt ein Modellsystem für die Untersuchung antimikrobieller, membran-aktiver Peptide dar. Dies führte dazu, dass viele strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Melittin aufgeklärt werden konnten (Habermann, 1972; Terwillinger und Eisenberg 1982 a & b; Colotto *et al.*, 1993; Dempsey, 1990; Saberwal und Nagaraj, 1994).

In wässrigem Medium liegt Melittin bevorzugt als „random coil“ vor, kann jedoch auch eine α -helikale Konformation ausbilden, wobei die helikale Struktur an den Positionen 11 und 12 unterbrochen ist. Die beiden daraus resultierenden Helices sind über einen „loop“ miteinander verbunden und bilden einen Winkel von 120° (Terwillinger und Eisenberg, 1982). Die α -helikale Struktur von Melittin weist zudem aufgrund der asymmetrischen Verteilung der 6 positiven Ladungen einen amphiphilen Charakter auf. In Lösungsmitteln von hoher Ionenstärke, bei hohem pH oder auch bei hohen Peptid-Konzentrationen kann Melittin zum Tetramer assoziieren, da unter diesen Bedingungen die elektrostatische Abstoßung der positiven Ladungen innerhalb des Melittin-Moleküls minimiert wird und hydrophobe Interaktionen der Melittin Monomere gefördert werden (Bello *et al.*, 1982). Die tetramere Konformation von Melittin zeigt jedoch keine membran-aktive Eigenschaften (Hider *et al.*, 1983), nur Melittin ist dazu in der Lage an Membranen zu binden und toroidale Poren innerhalb der Membran auszubilden (Yang *et al.*, 2001). Der genaue Mechanismus hängt hierbei von der Lipid-zusammensetzung der jeweiligen Membran ab. Es kann jedoch generell ein Detergenz-ähnlicher Mechanismus angenommen werden, der bis zur Solubilisierung der Membran hin zu „disk“-förmigen Strukturen führen kann (Bechinger und Lohner, 2006).

Melittin sollte kovalent mit Aptamer 2-16 verknüpft werden und das daraus resultierende Konjugat sollte auf seine zytotoxische Wirkung auf Blutstrom-Trypanosomen getestet werden. Die Verknüpfung durch reduktive Aminierung führte zu hohen Ausbeuten zu einem 2-16~Melittin-Konjugat, allerdings zeigte sich, dass dieses im wässrigen, nicht-denaturierenden Medium nicht löslich war. Sowohl die nicht-verknüpfte RNA als auch das Konjugat präzipitierten im Laufe der Reaktion und konnten nur unter denaturierenden Bedingungen wieder in Lösung gebracht werden. Dies kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass es zur Aggregation des kationischen Peptids mit der polyanionischen RNA kam.

Wie bereits erwähnt liegt Melittin im wässrigen Medium bevorzugt in einer „random coil“-Struktur vor, da die elektrostatische Abstoßung der intrinsischen positiven Ladungen eine Strukturierung erschwert. Das Einbringen der stark-geladenen RNA erhöht die Ionenstärke der Melittin-Lösung erheblich, so dass es sehr wahrscheinlich zur Ausbildung α -helikaler und tetramerer Strukturen kommt. In dieser Konformation findet eine räumlich Trennung von hydrophilen und lipophilen Bereichen des Peptides statt. Insbesondere die tetramere Struktur zeichnet sich durch einen hydrophoben Kern aus, der von den geladenen Seitenketten bedeckt ist (Terwillinger und Eisenberg, 1982 a & b). Es kann angenommen werden, dass die RNA mit den exponierten geladenen Bereichen des tetrameren Melittins interagieren und Aggregate ausbilden kann.

Eine Möglichkeit, die Aggregation von Melittin und RNA zu vermeiden, liegt in der Maskierung der positiven Seitenketten des Peptides. Die positiven Ladungen des Melittins, insbesondere des Lysinrests an Position 7 sind essentiell für dessen lytische Aktivität (Blondelle und Houghten, 1991; Rozema *et al.*, 2003). Aus diesem Grund muss diese Maskierung in einer reversiblen Weise ausgeführt werden, um die lytische Aktivität bei Bedarf wieder herstellen zu können. Eine Möglichkeit dies in pH-abhängiger Weise zu erreichen, besteht in der Modifikation der ϵ -Aminogruppen der Lysin-Reste durch Maleinsäureanhydrid-Derivate, was zur Bildung einer pH-labilen Amidbindung führt (Rozema *et al.*, 2003). Somit besteht die Möglichkeit unter neutralen oder schwach basischen Bedingungen die positiven Ladungen des Melittins zu maskieren und dies zur Verknüpfung mit dem Aptamer 2-16 einzusetzen. Das entstehende Konjugat sollte keine lytischen Eigenschaften besitzen. Erst wenn dieses, vermittelt durch Aptamer 2-16, an die Zelle bindet und in saure Kompartimente internalisiert wird, sollte die Maskierung aufgehoben und die Poren-bildenden Eigenschaften von Melittin wieder hergestellt werden.

Es konnten Bedingungen erarbeitet werden unter denen die Maskierung von Melittin und nachfolgende Verknüpfung mit Aptamer 2-16 durch reduktive Aminierung eine hohe Ausbeute an löslichem Verknüpfungsprodukt lieferte. Da für die Verknüpfung mittels reduktiver Aminierung von Seiten des Peptids primäre Aminogruppen bereitgestellt werden mussten, führte die höchste Maskierungsgrad des Peptids nicht zur höchsten Ausbeute. Vielmehr zeigte sich, dass die Maskierung von 30 bis 50 % der Aminogruppen ausreichte, um die Aggregation und daraus resultierende Präzipitation der Reaktanten zu minimieren. Die Reinigung des 2-16~Melittin-Konjugats führte jedoch zum Verlust der Löslichkeit. Offensichtlich kam es im Verlauf der verschiedenen getesteten Reinigungsprozesse zur Demaskierung der Aminogruppen, was in der Aggregation und Präzipitation des Konjugats resultierte. Die Versuche zur Reinigung des Konjugats wurden unter schwach alkalischen Bedingungen durchgeführt, also unter Bedingungen, unter denen die maskierende Amidbindung stabil sein sollte. Die Demaskierung des Konjugats unter diesen

Bedingungen steht im Gegensatz zu bereits publizierten Daten (vgl. Rozema *et al.*, 2003), es konnte jedoch keine Lösung für diesen Sachverhalt gefunden werden. Aus diesem Grund wurden die Experimente zur Generierung eines 2-16~Melittin-Konjugats nicht weiter verfolgt.

Trotz des Scheiterns des Ansatzes zeigten die Experimente mit Melittin, dass die Verknüpfung der RNA mit einem Peptid durch reduktive Aminierung grundsätzlich möglich ist und ausreichende Ausbeuten an Konjugat liefert. Letztendlich scheiterte der Ansatz vermutlich an der positiven Ladung von Melittin, aufgrund dessen das Peptid unerwünschte Wechselwirkungen mit der RNA einging. Aus diesem Grund wurde der grundsätzliche Ansatz, ein membranaktives Peptid mit dem Aptamer 2-16 zu verknüpfen weiterverfolgt.

4.1.4.3 Der zytotoxische Effekt des 2-16~GALA-Konjugats

Das synthetische Peptid GALA besteht aus 30 Aminosäuren, das als repetitives Element das Tetrapeptid Glutaminsäure-Alanin-Leucin-Alanin (EALA) enthält. Damit besitzt es einen ähnlichen Aufbau wie die zuvor diskutierten pH-abhängigen Polymere und Pseudopeptide (vgl. Abschnitt 3.3.1). Das repetitive Element verfügt sowohl über einen hydrophoben Teil (ALA) als auch über einen je nach pH-Bedingungen deprotonierten, negativ-geladenen Anteil (G) (Subbarao *et al.*, 1987; Parente *et al.*, 1988). Dies verleiht GALA pH-abhängige strukturelle Charakteristika, wobei es unter neutralen und leicht basischen Bedingungen eine ungeordnete Struktur einnimmt und unter sauren Bedingungen zu amphiphatischen Helix konvertieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass GALA in seiner amphiphatischen, helikalen Konformation die Fusion von Membranen medieren (Parente *et al.*, 1988), Membranen fragmentieren (Subbarao *et al.*, 1988) und durch Porenbildung permeabilisieren (Subbarao *et al.*, 1987; Parente *et al.*, 1990) kann.

Für den Mechanismus dieser porenbildenden Aktivität kann das folgende Modell angenommen werden (Abbildung 38, Li *et al.*, 2004): Unter sauren pH-Bedingungen bindet GALA an die Oberfläche von Doppelipidmembranen, wo es planare Aggregate ausbildet, die parallel zur Membranoberfläche ausgerichtet sind. Hierbei ist die hydrophobe Seite der amphiphatischen Helix leicht in die Membran eingebettet, während die polare Seite der wässrigen Umgebung zugewandt ist. Mit steigender Peptidkonzentration in der Membran können die planaren Aggregate expandieren, bis ca. 10 GALA-Moleküle assembliert sind. Ab dieser kritischen Anzahl dringen die GALA-Helices entweder einzeln oder im assemblierten Zustand in die Membran ein, wo sie eine wasserdurchlässige Pore bestehend 10 ± 2 GALA-Molekülen ausbilden (Nicol *et al.*, 1999). Innerhalb der Pore liegt GALA in seiner α -helikalen Konformation vor, wobei die Helix-Achse senkrecht zur Membranoberfläche ausgerichtet ist.

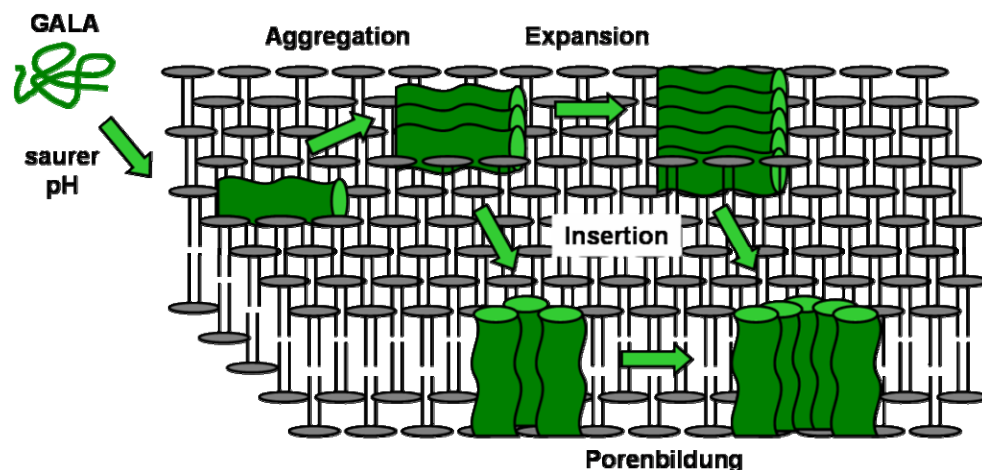


Abbildung 38: Modell der Porenbildung durch GALA unter sauren pH-Bedingungen. GALA bindet an Doppellipidmembranen, wo es planare Aggregate bildet die parallel zur Membran ausgerichtet sind. Die Aggregate können mit steigender Peptidkonzentration in der Membran expandieren und in die Membran eindringen, wo sie wässrige Poren bilden. (Abb. modifiziert nach Li *et al.*, 2003)

GALA sollte kovalent mit Aptamer 2-16 verknüpft werden. Das entstehende Konjugat sollte mit Hilfe der spezifischen Bindung von Aptamer 2-16 in die flagellare Tasche der Parasiten dirigiert werden, wo es über Endozytose in saure Kompartimente der Zelle aufgenommen werden sollte. Die sauren Bedingungen würden dort zur Konformationsänderung und Aktivierung der Porenbildenden Eigenschaften von GALA und daraus resultierend zum Absterben der Zelle führen. Zunächst wurde der Einfluss von nicht-verknüpftem GALA auf Blutstrom-Trypanosomen getestet. Unter neutralen Bedingungen zeigte GALA im getesteten Konzentrationsbereich keine zytotoxische Aktivität gegenüber Blutstrom-Trypanosomenzellen, d.h. offensichtlich findet keine signifikante unspezifische Endozytose von GALA durch die Zellen statt. GALA sollte unter neutralen Bedingungen in einer „random coil“-Struktur vorliegt und keinerlei Bindemotive besitzen. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass es unspezifisch an Rezeptoren der Trypanosomen Oberfläche bindet und in folge dessen über Rezeptor-medierte Endozytose in das Zellinnere gelangt. Jedoch wäre es denkbar, dass GALA unspezifisch mit anderen Oberflächenproteinen assoziiert und im Zuge des raschen Oberflächenaustauschs in den endozytotischen Apparat der Trypanosomenzelle gelangt. Die Tatsache, dass keine Zytotoxizität von GALA nachgewiesen werden konnte, deutet darauf hin, dass GALA entweder nicht mit der trypanosomalen Oberfläche interagiert, trotz Interaktion nicht in ausreichendem Maße aufgenommen wird, oder trotz Aufnahme nicht in sauren Kompartimenten angereichert wird. Da Aptamer 2-16 eine deutliche Aufnahme zeigt, sollte die Verknüpfung von GALA mit der 2-16 RNA einen Effekt aufweisen. Die Verknüpfung von RNA und Peptid erfolgte auch hier durch reduktive Aminierung, indem das Peptid im Überschuss zur 3'-oxidierten RNA eingesetzt

wurde. Vergleicht man die Bedingungen der Verknüpfungsreaktionen von Melittin bzw. GALA und dem Aptamer 2-16, so fällt auf, dass im Fall von GALA ein um eine Größenordnung höherer molarer Überschuss von GALA gegenüber der RNA benötigt wurde, um ähnliche Ausbeuten wie im Fall der Verknüpfung mit Melittin zu erhalten. Dies lässt sich vermutlich anhand folgender Sachverhalte erklären:

Da GALA nur eine primäre Aminogruppe besitzt, fand die Reaktion positionsspezifisch zwischen dem oxidierten 3'-Ende der RNA und dem Aminoterminus des Peptids statt. Im Fall des Melittins konnte die Reaktion an 6 möglichen Stellen innerhalb des Peptids erfolgen, der molare Überschuss an möglichen Reaktionspartnern vervielfältigte sich im Fall von Melittin auch nach der Maskierungsreaktion um die Anzahl der freien Aminogruppen. Zudem ist GALA im Gegensatz zu Melittin stark negativ geladen. Während die positiven Ladungen des Melittins zwar die Aggregation mit der polyanionischen RNA fördern aber dennoch die Interaktion der Moleküle und damit die Reaktion erleichtern, wird die Verknüpfung von GALA und Aptamer 2-16 vermutlich durch die elektrostatische Abstoßung der beiden negativ geladenen Reaktionspartner inhibiert.

Aus diesem Grund wurde die Reaktion in Anwesenheit von verschiedenen Salzen getestet, die einen Ladungs-maskierenden Effekt auf Peptid und RNA ausüben und so die Abstoßung vermindern sollten. Es zeigte sich, dass die Zugabe von Natriumchlorid keinen Effekt auf die Reaktion hatte, während die Reaktion in Gegenwart von Kaliumchlorid eine höhere Ausbeute aufwies als in Abwesenheit von Salz. Das Natriumion ist im hydratisierten Zustand größer als das Kaliumion, demnach könnte aus sterischen Gründen das Kaliumion besser zur Maskierung der negativen Ladungen des Peptids geeignet sein.

Für einen zytotoxischen Effekt auf Blutstrom-Trypanosomen ist es notwendig, dass das auf diese Weise gewonnene 2-16~GALA-Konjugat an die Zelle bindet. Dies sollte möglichst an die Bindestelle des nicht verknüpften Aptamers erfolgen, damit das Konjugat auf demselben endozytotischen Weg in die Zelle aufgenommen wird. Zur Analyse des Bindeverhaltens des Konjugats wurde intern Biotin-markierte RNA in Verknüpfungsexperimenten eingesetzt und das resultierende Konjugat wurde von nicht verknüpftem GALA und freier RNA abgetrennt. Das gereinigte Biotin-markierte Konjugat wurde in Zellbindungsexperimenten mit lebenden Blutstrom-Trypanosomen verwendet, wobei das gebundene Konjugat mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten α -Biotin-Antikörpers detektiert wurde. Die Zellbindungsexperimente wurden bei 4°C durchgeführt um endozytotische Vorgänge und somit eventuelle zytotoxische Effekte zu inhibieren. Unter diesen Bedingungen konnte das Konjugat in der flagellaren Tasche der Parasiten detektiert werden und es konnte kein Unterschied zur Bindung der nicht-verknüpften RNA festgestellt werden. Offensichtlich wurde die Bindestelle des Aptamers durch die Verknüpfung mit GALA nicht beeinträchtigt. Allerdings kann an dieser Stelle keine quantitative Aussage über die Affinität, d.h. die

Dissoziationskonstante des Konjugats getroffen werden. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass das Konjugat zwar noch die gleiche Bindestelle wie das freie Aptamer bindet, allerdings mit veränderter Affinität. An dieser Stelle sollte jedoch nur eine qualitative Aussage über das Bindeverhalten des Aptamers genügen, da letztendlich die Zytotoxizität des Konjugats von Interesse ist.

Der Einfluss des Konjugats auf Blutstrom-Trypanosomen wurde getestet und es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt. Der LD₅₀-Wert konnte mit 3 µM ermittelt werden, wobei nahezu alle Zellen bei einer Konzentration von 10 µM abgetötet wurden. Dies entspricht einer Anzahl von $6 \cdot 10^7$ 2-16~GALA Molekülen, die zum Abtöten einer Trypanosomenzelle notwendig sind. Wie bereits diskutiert, konnte der selbe Effekt auch für ein Derivat des im menschlichen Serum vorkommenden Trypanosomen-lysierenden Faktors ApoL1 gezeigt werden, der mit einem Antikörper-Fragment verknüpft in die Zelle dirigiert wird und dort Poren in der lysosomalen Membran verursacht (Baral *et al.*, 2006). Hier wurde ermittelt, dass 10^8 Molekülen notwendig sind um eine Trypanosomenzelle der Blutstromform zu lysieren. Damit liegt die erforderliche Dosis des 2-16~GALA-Konjugats sogar leicht unter dem Wert der für das ApoL1-Konjugat festgestellt wurde. Dies könnte auf eine etwas höhere lytische Aktivität des GALA-Moleküls im Vergleich zu ApoL1 hindeuten, oder aber auf eine höhere Affinität der Aptamer-vermittelten Bindung und damit eine effektivere Aufnahme des Aptamer-Konjugats als im Fall des ApoL1-Konjugats. Für das bei dem ApoL1-Konjugat verwendete Antikörper-Fragment konnte ein K_d im nM Bereich ermittelt werden (Stiljemans *et al.*, 2004), was im selben Bereich wie die Affinität des Aptamer 2-16 liegt. Jedoch ist sowohl für das Aptamer als auch für das Antikörper-Fragment nicht bekannt, inwiefern die Verknüpfung mit GALA bzw. mit ApoL1 die Affinität der Bindung beeinflusst.

Abgesehen von der etwas erhöhten Effektivität besteht ein weiterer Vorteil des 2-16~GALA-Konjugats in der VSG-unabhängigen Bindung. Das Antikörperfragment bindet zwar an eine konservierte, kohlenhydratreiche Region des VSGs und sollte somit indiskriminativ an alle VSG-Varianten binden. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindeaffinität durch die antigene Variation der Parasiten, d.h. den Austausch der VSG-Variante auf der Oberfläche beeinflusst wird.

Der genaue Mechanismus der durch das 2-16~GALA-Konjugat vermittelten Zytotoxizität konnte bis jetzt nicht aufgeklärt werden. Es wurden Experimente durchgeführt, in denen das Lumen des Lysosoms mit fluoreszenzmarkiertem Dextran beladen und auf diese Weise visualisiert wurde. Im Gegensatz zu dem Effekt, der für das ApoLI-Konjugat publiziert wurde (Baral *et al.*, 2006), zeigte sich bei der Inkubation der Zellen mit dem 2-16~GALA-Konjugat keine Vergrößerung des Lysosoms. Es kam demnach nicht zum osmotischen Einstrom, der im Fall von ApoLI als Folge der Porenbildung in der lysosomalen Membran beobachtet wurde. Es konnte allerdings im Fall der mit dem 2-16~GALA-Konjugat

behandelten Zellen ein genereller Verlust in der Fluoreszenzintensität der angefärbten Lysosomen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Membranintegrität des Lysosoms durch das Konjugat zerstört wird, weshalb es zum Ausstrom des lysosomalen Inhalts kommt. Auf der Basis dieser Beobachtungen kann festgestellt werden, dass die Lyse der Trypanosomenzellen mit dem Verlust der lysosomalen Membranintegrität einhergeht. Jedoch unterliegt dieses Phänomen offensichtlich einem anderen Mechanismus als die ApoLI-vermittelte Poren-Bildung.

4.1.5 Die nächsten Schritte zum therapeutischen Nutzen von Aptamer 2-16

Ziel der hier diskutierten Experimente war es, Aptamer 2-16 von einem *in vitro* bindenden Molekül in eine therapeutisch nutzbare und aktive Substanz zu konvertieren. Das RNA-Molekül sollte zunächst hinsichtlich seiner pharmakologischen Eigenschaften optimiert werden. Es gelang, dem Aptamer mit Hilfe von 2'-Modifikationen eine hohe Stabilität gegenüber im menschlichen Serum enthaltenen Nukleasen zu verleihen. Zudem konnte das Aptamer mit Polyethylen verknüpft werden, was die Ausscheidung verlangsamen und so die Verweildauer im Körper erhöhen sollte. An dieser Stelle ist es nun notwendig, anhand von *in vivo*-Experimenten den Einfluss der beschriebenen Modifikationen zu überprüfen. Hierfür sollen modifizierte Aptamer-Varianten einem Wirtsorganismus, z.B. einer Maus verabreicht werden und deren Verteilung im Körper über die Zeit analysiert werden. Dies setzt voraus, dass die beschriebenen Modifikationsarten kombiniert eingesetzt werden, d.h. dass 2'-F-dC/dU-substituierte 2-16 RNA mit mPEG₁₀₀₀₀ modifiziert wird. Zusätzlich muss eine Modifikation eingeführt werden, die die Detektion der RNA im Körper erlaubt. Diese Modifikation muss entsprechend der Detektionsmethode ausgewählt werden. So kann z.B. die Ausscheidungsrate bzw. Verteilung des Aptamers im Körper mit Hilfe radioaktiver Markierung der RNA ermittelt werden, indem Urin und Gewebeprobe über die Zeit gesammelt und szintillatorisch vermessen werden (Healy *et al.*, 2004). Die Biodistribution von Aptameren kann über Positronen-Emissions-Tomographie (PET) verfolgt werden (Younes *et al.*, 2002). Auch hierfür ist es notwendig, eine radioaktive Markierung einzuführen, wobei üblicherweise kurzlebige β^+ -Strahler wie ^{18}F , ^{76}Br und ^{11}C verwendet werden. In dem hier dargestellten Fall würde sich die Modifikation mit ^{18}F anbieten, da das Aptamer in seiner 2'-F-substituierten Variante getestet werden soll. Auch diese Modifikationsvarianten müssen hinsichtlich ihrer Bindecharakteristika analog zu den Einzelmodifikationen analysiert werden. Zudem besteht hier die Möglichkeit mit Hilfe unterschiedlicher Markierungsarten den Verbleib eventuell auftretender Abbauprodukte im Körper zu verfolgen.

Zusätzlich muss die Anwendbarkeit des 2-16~GALA-Konjugats *in vivo* getestet werden, wobei die Verknüpfung der RNA mit dem Peptid mit den anderen Modifikationsarten kombiniert werden muss. Im Hinblick auf die Kombination der Verknüpfung mit Polyethylenglycol und GALA wurde der Mechanismus der Verknüpfungen so gewählt, dass beide gleichzeitig möglich sind, da sie an unterschiedlichen Enden des RNA-Moleküls erfolgen. Auch hier bleibt nachzuweisen, dass die Bindung durch die nun dreifache Modifikation (2'-F-Substitution, 5'-PEGylierung, 3'-Verknüpfung mit GALA) die Bindeaktivität des Aptamers nicht signifikant beeinträchtigt. Für *in vivo*-Experimente mit Trypanosomen-infizierten Säugern würden zunächst Mäuse bevorzugt, da sie ein gut untersuchter Wirtsorganismus für Trypanosomeninfektionen darstellen und der Nachweis der Parasitämie im Blut leicht durchgeführt werden kann. Zudem könnten hier bereits Aussagen über die Verträglichkeit der Konjugats getroffen werden, indem eventuell auftretende Nebenwirkungen analysiert werden können.

4.2 Die indirekte Nutzung von Aptamer 2-16 zu therapeutischen Zwecken

4.2.1 Isolierung von Trypanosomen-bindenden Substanzen durch Aptamer 2-16

Die in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Experimente dienten dazu, Aptamer 2-16 Eigenschaften zu verleihen, die aus pharmakologischer Sicht den Einsatz des Aptamers als Therapeutikum ermöglichen. Ein weiterhin bestehender Nachteil liegt jedoch in den hohen Synthesekosten, die ein RNA-basiertes Therapeutikum mit sich bringt. Diese erschweren seinen Einsatz insbesondere in Entwicklungsländern, dort wo Infektionskrankheiten am weitesten verbreitet sind. Aus diesem Grund besteht ein weiterer Ansatz darin, Aptamere nicht selbst als Therapeutika zu nutzen, sondern zur Identifizierung pharmakologischer Leitsubstanzen zu verwenden. Der Vorteil hierbei liegt in der einfachen, schnellen und spezifischen Selektion von Aptameren, die theoretisch gegen jede gewünschte Zielstruktur erfolgen kann. Aptamere können leicht markiert und detektiert werden, so dass sie als Sonde in vielfältigen funktionellen Analysen eingesetzt werden können. Die funktionellen Tests können in Gegenwart von kompetierenden Substanzen durchgeführt werden, wobei anhand der Aptamer-verdrängenden Eigenschaften auf deren Funktionalität geschlossen werden kann. Auf diese Weise können chemische Bibliotheken nach Molekülen durchsucht werden, die dieselben funktionellen Charakteristika wie das Aptamer aufweisen, ohne für jede einzelne Komponente ein Nachweissystem etablieren zu müssen. So konnten Nukleinsäure-Aptamere durch Substanzen ersetzt werden, die gleiche funktionelle Eigenschaften aufweisen (Green *et al.*, 2001) und auch Peptid-Aptamere wurden bereits für solche Zwecke eingesetzt (Baines und Colas, 2006). Für die Auswahl der zu testenden Komponenten innerhalb einer chemischen Bibliothek existieren verschiedene Strategien. Eine Möglichkeit besteht darin, Substanzen willkürlich auszuwählen, um so eine hohe Variabilität innerhalb der Bibliothek zu erhalten. Eine andere Möglichkeit beruht auf bereits gewonnenen Daten über die zu kompetierende Interaktion, indem gezielt Bibliotheken zusammengestellt werden, deren Komponenten der zu kompetierenden Substanz z.B. hinsichtlich Größe, Ladung oder Struktur ähneln. Diese Zusammenstellungen von Substanzen mit ähnlichen Charakteristika werden auch als fokussierte Bibliotheken bezeichnet und es hat sich gezeigt, dass sorgfältig ausgewählte fokussierte Bibliotheken oft bei wesentlich geringerer Probenzahl weitaus präzisere „Treffer“ liefern als eine zufällig zusammengestellte Substanzbibliothek (Lewis, 1999; Beavers und Chen, 2002). Es ist ebenfalls möglich, Substanzen nicht hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften auszuwählen, sondern z.B.

nach ihrer Herkunft, Preis und Verfügbarkeit. Beispielsweise stellen Naturstoffe eine Molekülgruppe dar, die traditionell in der Suche nach pharmakologisch aktiven Substanzen eingesetzt wurde und aus der eine Vielzahl von Therapeutika hervorgingen (Butler, 2004).

In den hier vorgestellten Experimenten wurde eine Bibliothek bestehend aus 1028 Substanzen auf ihre Fähigkeit getestet, Aptamer 2-16 von seiner Bindestelle auf der Oberfläche von lebenden Blutstrom-Trypanosomen zu verdrängen. Bei der Bibliothek handelte es sich um eine Zusammenstellung von Naturstoffen mikrobieller, tierischer und pflanzlicher Herkunft, sowie Naturstoffderivate und synthetische Naturstoffanaloga. Die Substanzen deckten eine Vielzahl verschiedener Substanzklassen ab, es handelte sich also nicht um eine fokussierte Bibliothek, sondern um eine Zusammenstellung von Substanzen unterschiedlichster Strukturen und Charakteristika.

Blutstrom-Trypanosomen wurden mit Aptamer 2-16 in Gegenwart eines vielfachen molaren Überschusses der jeweiligen Substanzen inkubiert und der Anteil an gebundener RNA quantifiziert. Substanzen, die mit dem Aptamer um dessen Bindestelle konkurrieren sollten einen signifikanten Rückgang in dem Anteil gebundener RNA erzeugen, was in 29 von 1028 Fällen beobachtet werden konnte. Damit ergibt sich eine „Trefferquote“ von 2,8 %, was für den Einsatz einer zufällig ausgewählten Bibliothek zu hoch erscheint. Dies bestätigte sich anhand weiterer Experimente, in dem nur 7 der 29 zuvor positiv getesteten Substanzen eine konzentrationsabhängige Verdrängung des Aptamers 2-16 aufwiesen. Alle anderen Substanzen zeigten keinen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Bindung der RNA, demnach handelte es sich hierbei um falsch-positive „Treffer“. Zusätzlich wurden die Komponenten auf ihre Zytotoxizität getestet, da ein Absterben der Trypanosomenzellen ebenfalls einen Rückgang in der Bindung verursachen und unter anderem ein Grund für die Identifizierung von falsch positiven „Treffern“ wäre. Es zeigte sich, dass 19 der 29 getesteten Komponenten zum Absterben der Trypanosomenzellen führten, der Rückgang der Bindung war in diesen Fällen demnach nicht auf die Verdrängung von Aptamer 2-16 von der trypanosomalischen Oberfläche zurückzuführen.

Es konnte schließlich nur für zwei Substanzen eine konzentrationsabhängige Verdrängung von Aptamer 2-16 festgestellt werden, die nicht auf zytotoxische Effekte zurückzuführen war. Es handelte sich bei diesen Substanzen um das Triterpen Quercinsäure, sowie eine Substanz unbekannter Herkunft die nicht weiter analysiert wurde. Für beide Substanzen konnte ein K_{dC} bestimmt werden, der 2-3 Größenordnungen über dem K_d von Aptamer 2-16 lag, wobei dies keine Aussage über den tatsächlichen K_d der Substanz zulässt. Es kann jedoch angenommen werden, dass die Affinität der jeweiligen Substanz zu ihrer Zielstruktur geringer ist, als die Affinität des zu verdrängenden Aptamers, da bei einer höheren Affinität der kompetierenden Substanz in dem hier dargestellten

experimentellen Ansatz keine konzentrationsabhängige Verdrängung beobachtet und damit kein K_{dC} ermittelt werden könnte.

Bei Quercinsäure handelt es sich um ein Triterpen, das zuerst aus *Daedalea quercina*, einem Pilz aus der Familie der *Polyporaceae* isoliert wurde, aber auch in anderen ungenießbaren Pilzen vorkommt (Rösecke und König, 2000; Quang *et al.*, 2005). Es stellte sich die Frage, ob Quercinsäure das Aptamer aus dessen Bindestelle verdrängt, weil es eine Affinität für dieselbe Bindestelle besitzt oder weil sie das Aptamer selbst bindet. Dies sollte durch die Modifizierung der Quercinsäure mit einer detektierbaren Gruppe und Visualisierung der Bindung erfolgen. Zu diesem Zweck wurde die Carboxylgruppe des Moleküls über einen aliphatischen „spacer“ mit einem Biotin-Molekül verknüpft. Die biotinylierte Substanz wurde mit lebenden Blutstrom-Trypanosomen inkubiert und die Bindung mit einem α -Biotin-Antikörper detektiert. Es zeigte sich in der Tat ein Signal in der flagellaren Tasche der Parasiten. Dies deutet nicht nur darauf hin, dass Quercinsäure an die Trypanosomenzellen bindet, sondern dass die Bindung an dieselbe Bindestelle erfolgt, an die auch Aptamer 2-16 bindet. Es konnte zudem gezeigt werden, dass biotinylierte Quercinsäure durch die Zellen endozytiert wird und sich im Lysosom der Zellen anreichert, wobei dieser Aufnahmeweg auch für Aptamer 2-16 beobachtet wird.

Es gelang demnach aus einer 1028 Substanzen umfassenden Naturstoffbibliothek eine Komponente zu isolieren, welche qualitativ dieselben Bindeeigenschaften wie Aptamer 2-16 aufweist. Die Bindung scheint zudem durch die Modifikation der Carboxylgruppe nicht beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass die negative Ladung nicht in die Bindung beiträgt, sondern dass andere strukturelle Eigenschaften der Substanz die Bindung vermitteln. Der Bindemodus konnte an dieser Stelle nicht aufgeklärt werden. Da sich die Substanz jedoch modifizieren und damit markieren lässt, können im weiteren Untersuchungen zur quantitativen Analyse der Bindeparameter durchgeführt werden. Eine genaue Analyse der Affinität, d.h. die Bestimmung der Dissoziationskonstante ist die Voraussetzung für die Optimierung der Aptamer-verdrängenden Eigenschaften. In dem hier vorliegenden Fall würde das bedeuten, die triterpenoide Struktur der Quercinsäure an allen möglichen Stellen zu modifizieren und diese Modifikationen zu permutieren. Die Substanz wird so als Leitstruktur betrachtet, aus der durch Modifikation der Seitengruppen ein Set an Molekülen entwickelt werden kann, die eine fokussierte Bibliothek bilden. Deren Analyse soll zur Optimierung der Bindungseigenschaften des Moleküls führen.

Auf diese Weise sollte es möglich sein, ein Molekül zu selektionieren, das optimale Aptamer-verdrängende Eigenschaften aufweist. Wie auch das Aptamer würde dieses Molekül selbst jedoch noch keine therapeutischen Effekte erzielen. Aus diesem Grund ist es zudem notwendig das selektionierte Molekül analog zur Modifizierung von Aptamer 2-16 mit einer therapeutisch aktiven Substanz zu

verknüpfen, die auf diese Weise in das Zellinnere eingebracht werden kann und dort eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen ausübt.

4.2.2 Der Ausblick – Nukleinsäureaptamere zur Isolierung von Leitsubstanzen

Die hier vorgestellten Experimente zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist Aptamere als Sonden für die Isolierung kleiner chemischer Moleküle zu verwenden, die eine biologische Aktivität hinsichtlich lebender Trypanosomenzellen zeigen. Es liegt deshalb nahe, diesen Ansatz auch mit Aptameren durchzuführen, die andere Bindespezifitäten aufweisen. Es konnte ein RNA-Aptamer generiert werden, dass mit hoher Affinität an einen invarianten Bereich von VSG-Molekülen bindet (Lorger *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass dieses Aptamer mit einem Signalmolekül verknüpft zur VSG-unabhängigen Markierung der trypanosomalen Oberfläche genutzt werden kann. Dies stellt aus therapeutischer Sicht eine Möglichkeit dar, die antigene Variation der Parasiten zu umgehen und invariante Bereiche der Oberfläche indirekt für das Immunsystem des Wirtes zugänglich zu machen. Analog zu den hier dargestellten Experimenten könnte dieses Aptamer durch kleine chemische Moleküle ersetzt werden. Diese könnten wie im Fall der Quercinsäure z.B. durch Biotin modifiziert werden, was dem Molekül immunogene Eigenschaften verleiht. Zusätzlich können diese Moleküle, sofern eine Markierung ohne Verlust der Trypanosomen-bindenden Eigenschaften möglich ist, zur Detektion der Zellen verwendet werden. Dies könnte zur Diagnose von Trypanosomeninfektionen eingesetzt werden, beispielsweise in Kombination mit Oberflächenresonanzsystemen. Diese Möglichkeit ist von besonderem Interesse, da präzise und sensitive Nachweisverfahren dringend benötigt werden um eine erfolgreiche Behandlung der Infektion zu gewährleisten.

Eine weitere Möglichkeit, Aptamere zu nutzen, liegt in der Charakterisierung ihrer Bindestelle. Falls das Zielmolekül bekannt ist, können Versuche unternommen werden, das Aptamer mit seinem Zielmolekül zu kristallisieren, um aus den dadurch ermöglichten Röntgenstrukturanalysen Aufschluss über die an der Interaktion beteiligten Bindungen zu erhalten. Eine Alternative hierfür stellen NMR-Analysen dar, in denen Informationen über den Bindemodus des Aptamers gewonnen werden können. Diese Informationen können dann genutzt werden, um Liganden mit denselben oder komplementären Bindeeigenschaften zu generieren. Hierfür können virtuelle Durchmusterungen von chemischen Bibliotheken durchgeführt werden, in denen eine Vielzahl von Molekülen zunächst ohne biologische Funktionsanalysen hinsichtlich ihrer Bindeeigenschaften analysiert werden können (Kunz, 1992; Jorgensen, 2004; Stahura und Bajorath, 2004).

Dieser Ansatz beruht auf der sogenannten Pharmacophor-Theorie, die bereits Anfang des 20. Jahrhunderts durch Paul Ehrlich entwickelt wurde. Hierbei wird das Pharmacophor als Gerüst betrachtet, das die essentiellen Eigenschaften beinhaltet, die für die biologische Aktivität einer Substanz verantwortlich sind (Ehrlich, 1909). Im Zuge der fortschreitenden Erkenntnisse bezüglich dreidimensionaler molekularer Strukturen wurde dieses Konzept um räumliche Anforderungen der essentiellen molekularen Eigenschaften erweitert, wie z.B. sterische und elektrostatische Charakteristika oder Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden (Loew *et al.*, 1993). Die Pharmacophor-Modelle können anhand der Definition funktioneller Gruppen wie Wasserstoffbrückendonatoren oder -akzeptoren, hydrophoben oder geladenen Gruppen und aromatischer Ringsysteme charakterisiert werden. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass eine funktionelle Gruppe gleichzeitig mehrere dieser Charakteristika tragen kann. Aus diesem Grund werden nicht nur chemische Eigenschaften der Moleküle berücksichtigt, sondern ebenfalls Daten aus Struktur/Funktions-Analysen in die Beschreibung der Pharmacophore mit eingebunden. Dasselbe gilt für Parameter, welche die äußere Form der bindenden Moleküle beschreiben und ebenfalls in die Charakterisierung mit einbezogen werden müssen (Chang *et al.*, 2006). Die Identifizierung von Substanzen, die ähnliche Eigenschaften wie das Pharmacophor aufweisen kann mithilfe unterschiedlicher Algorithmen erfolgen (Van Drie *et al.*, 1989; Clark *et al.*, 1993; Ho und Marshall, 1993). Hierbei kann die Diversität der erhaltenen „Treffer“-Substanzen dadurch erhöht werden, dass systematisch ein oder mehrere Charakteristika des Pharmacophors im Auswahlprozess nicht berücksichtigt werden (Chang *et al.*, 2006). Je „flexibler“ die Suche nach geeigneten Substanzen gestaltet wird, umso größer ist die Anzahl an „Treffer“-Substanzen. Aus diesem Grund ist es notwendig im Anschluss an die Identifizierung von „Treffer“-Substanzen weitere Filterkriterien anzulegen, welche die Anzahl reduzieren. Dies hat zur Folge, dass nur die vielversprechendsten Treffersubstanzen weiter analysiert werden und gleichzeitig die Anzahl der im Folgenden zu testenden Substanzen auf eine handhabbare Zahl verkleinert wird. Üblicherweise besteht der erste Schritt dieser Filterung darin, Substanzen nach Ähnlichkeiten oder Molekulargewicht zu gruppieren. Ein wichtiges Kriterium stellen auch die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzen dar (siehe Abschnitt 2.2). Sie können anhand ihrer ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Exkretion)-Profile eingeordnet (Thompson, 2000) sowie anhand Lipinskis „rule of five“ bewertet werden (Lipinski, 2001). Die auf diese Weise ausgewählten Substanzen bilden nun selbst eine fokussierte Bibliothek, die mittels *in vitro* Analysen getestet werden kann, um letztendlich funktionelle Moleküle von nicht funktionellen zu trennen.

5 Materialien

5.1 Chemikalien

α -[^{32}P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartman analytic
γ -[^{32}P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartman analytic
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Roth
2-Mercaptoethanol	Sigma
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (Hepes)	Roth
5-[^{32}P]-pCp (3000 Ci/mmol)	Hartman analytic
2'-Fluor-2'-Deoxycytosin-5'-triphosphat (2'-F-CTP)	Tebu-Bio/Trilink
2'-Fluor-2'-Deoxyuridin-5'-triphosphat (2'-F-CTP)	Tebu-Bio/Trilink
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1; 40 % (w/v))	Roth
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Natriumsalz	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Azobisisobutyronitril (AIBN)	Acros Organics
Bacto Yeast Extract	BD
Bacto-Trypton	BD
Bathocuproin-Disulfonsäure	Sigma
Biotin-11-ATP	Perkin Elmer
Biotin-16-UTP	Perkin Elmer
Borsäure	Roth
Bradford-Reagens	Biorad
Bromphenolblau	Roth
BSA (Rinder-Serumalbumin, Fraktion V)	Biomol
Calcein-AM	BioChemica
Chloroform (CHCl_3)	Roth
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck
Cysteamin	Sigma
Cytidin-5'-triphosphat (CTP), Natriumsalz	Roth
DEAE BioGel Agarose	BioRad
Dibutylphthalat	Aldrich
Dichlormethan	Applied Biosystems
Diethylamin	Acros Organics
Diethylether	Fluka
Diethylpropylmalonat	Acros Organics

Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Roth
Dimethyl-2-oxoglutarat	Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dodecandisäuredichlorid	Acros Organics
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid	Fluka
Ethanol	Roth
Ethanolamin	Fluka
Ethidumbromid	Roth
Ethylacetat	Acros Organics
Formaldehyd	Roth
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma
Glukose	Sigma
Glyzerin	Sigma
Guanosin-5'-triphosphat (GTP), Natriumsalz	Roche
H_2SO_4	Roth
Harnstoff	Roth
HCl	Roth
Hexan	Acros Organics
Hypoxanthin	Sigma
IMDM-Pulver (ohne Glutamin, ohne $NaHCO_3$)	Gibco BRL
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Roth
K_2CO_3	Acros Organics
KCl	Roth
KOH	Roth
L-Cystein	Roth
L-Lysin	Sigma
Melittin	BioChemica
Methanol	Roth
Methylenblau	Merck
$MgCl_2$	Roth
$MgSO_4$	Roth
Monomethoxypolyethylenglycol (5 kDa)	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Na_2HPO_4	Merck

NaCl	Roth
NaCNBH ₃	Merck
NaF	Sigma
NaH	Aldrich
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaHCO ₃	Merck
NaIO ₄	Sigma
NaOH	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumcacodylat	Sigma
Natriumzitat	Gibco BRL
Na ₂ EDTA	Roth
Natriumpyruvat	Sigma
N-ethyl-N'-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC)	Acros Organics
O-(Aminoethyl) O'-Methylpolyethylenglycol (mPEG-NH ₂) (10 kDa oder 20 kDa)	Roth
Paraformaldehyd	Roth
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	Gibco BRL
Pentamin-Biotin	Pierce
Phenol (äquilibriert mit TE, pH 7.5)	Roth
SDS	Roth
Spermidin	Roche
Spermin	Merck
Stickstoff	Air Liquide
Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint [®])	Roth
Tetrahydrofuran	Riedel de Haen
Thymidin	Sigma
Triethyl-2-Phosphopropionat	Aldrich
Triethylamin	Fluka
Trinitrobenzolsulfonsäure	Fluka
Tris(Hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Roth
tRNA (Hefe)	Sigma
Uridin-5'-triphosphat (UTP), Natriumsalz	Roth
Xylencyanol	Merck

5.2 Bibliotheken

RNA-Bibliotheken

Unmodifizierte und 2'-F-dC/dU-substituierte RNA-Bibliotheken wurden durch *in vitro* Transkription einer doppelsträngigen DNA-Bibliothek generiert (Homann und Göringer, 1999; Lörger *et al.*, 2003).

Naturstoffbibliothek

Eine Naturstoffbibliothek bestehend aus 1028 Substanzen wurde vom „Leibniz-Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie“ in Jena zur Verfügung gestellt. Von jeder Substanz wurden 10 µL einer 1 mg/mL Lösung in DMSO in einer 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt.

5.3 Zelllinien

Trypanosoma brucei brucei

T. brucei 427 (Cross und Manning, 1973)

verwendete Serodeme: *T. brucei* MITat 1.2 (Cross, 1975)

T. brucei MITat 1.4 (Cross, 1975)

E. coli

DH5α

Genotyp:

F⁻, φ80d/*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

(Hanahan, 1983).

5.4 Häufig verwendete Puffer und Medien

5.4.1 Medien

LB-Medium

Zur Kultivierung von Bakterien wurde das folgende Medium angesetzt: 1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast-Extract; 1 % (w/v) NaCl. Der pH wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt und das Medium durch autoklavieren sterilisiert.

HMI-9-Medium

Das HMI-9-Medium wurde zur Kultivierung von Blutstrom-Trypanosomen verwendet (Hirumi und Hirumi, 1994). Für 1 l Medium wurde angesetzt:

7,7 g	IMDM-Pulver
3,0 g	NaHCO ₃
13,6 mg	Hypoxanthin

3,9 mg	Thymidin
10 ml	Penicillin / Streptomycin (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml)
110 mg	Natriumpyruvat
28 mg	Bathocuproin-Disulfonsäure
182 mg	Cystein

Die Komponenten wurden in 890 mL entionisiertem Wasser gelöst, und das Medium wurde durch einen Sterilfilter (0,22 µm Porengröße) filtriert. Vor Gebrauch wurde das Medium mit den folgenden Komponenten supplementiert (Angaben pro Liter):

100 ml	Fötales Kälberserum (30 min bei 55°C hitzeinaktiviert)
14 µl	2-Meraptoethanol

5.4.2 Puffer

5x PBS:	100 mM $\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$, pH 7,4 600 mM NaCl 10 mM MgCl_2 25 mM KCl
----------------	---

PBSG:	1x PBS 20 mM Glucose 0,3 mM 2-Mercaptoethanol
--------------	---

Bindepuffer:	PBSG 100 ng/µL BSA 100 ng/µL tRNA (Hefe)
---------------------	--

TE, pH 7,4:	10 mM Tris/HCl, pH 7,4 1 mM Na_2EDTA
--------------------	---

TBE:	80 mM Tris 80 mM Borsäure 2 mM Na_2EDTA
-------------	---

5.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Roche
DNaseI/RNase frei	Roche
EcoRI	Roche
RNase T1	Fermentas
T4-Polynukleotidkinase	Fermentas

T4-RNA-Ligase (Roche)	Roche
T7-RNA-Polymerase	Fermentas
T7-RNA-Polymerase (Y639F-Mutante)	Eigene Herstellung, Reinigungsprotokoll modifiziert nach Bonner <i>et al.</i> , 1992. Details siehe Dissertation Mihaela Lorger, 2002.

5.6 Fluoreszenzfarbstoffe und Konjugate

Alexa 488-konjugiertes Dextran (10 kDa)	Molecular Probes
Anti-Biotin-Antikörper, Cy3-konjugiert, monoklonal, murin	Dianova
Hoechst 33342	Molecular Probes
SYBR-Green II	Fluka

5.7 Verbrauchsmaterialien

Erythrozytenkonzentrat	Deutscher Blutspendedienst, Frankfurt am Main
DEAE BioGel® Agarose	BioRad
Dialyseschlauch (1000 Da Ausschlussgröße)	Roth
Glaskugeln (4 mm)	Roth
Glaswolle	Merck
Kieselgel 100	Fluka
Mikrotiterplatten	Nalge Nunc Int., Greiner
Pasteurpipetten	Volac
Plastikküvetten	Eppendorf
Plastikpipetten	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt
Röntgenfilme	Kodak (Biomax MR)
Sephadex G-50 fine	Sigma
Sterilfilter (0.22 mm + 0.45 mm)	Roth, Millipore
Tropfendialysefilter (Nitrocellulose, 0.025 µm)	Millipore
Whatman 3 MM Papier	Whatman
Zellkulturflaschen	IBS Integra, Sarstedt

5.8 Geräte

Axioskop 2 (Mikroskop)	Zeiss
CCD-Kamera: Spot (Modell 1.4.1)	Visitron Systems
Centrifuge 5417 R (Tischzentrifuge)	Eppendorf

Entwicklermaschine	Agfa
Evolution RC (Zentrifuge)	Sorvall
Fluoro Image Analyzer FLA-5000 (Phosphorimager)	FujiFilm
Geiger-Müller-Zähler	Berthold Technologies
Geltrockner	Appligene
Geldokumentationssystem, IDA	Raytest
pH-Meter	Knick
Rotoren: SLC-6000, GS3, GSA, SS34	Sorvall
Speed vac (SVC 100)	Savant
Spektrophotometer	Amersham Ultrospec 3100 pro
Szintillationszähler	Hewlett Packard
Thermalspektrophotometer, Cary 100	Varian Inc.
Zellzählgerät	Schärfe System GmbH, Cell Counter + Analyser System CASY 1

5.9 Software

IPLab, 3.9.5 für Mac OS X	Scanalytics
Cary WinUV Bio Pack, Thermal Software	Varian Inc.
Excel 2003,	Microsoft
Igor Pro, 5.0	WaveMetrics
Image Gauge 4.23	FujiFilm
Photoshop 8.0	Adobe
PyMOL	DeLano Scientific
Word 2003	Microsoft

6 Methoden

6.1 Mikrobiologische Methoden

6.1.1 Bakteriologische Arbeiten

6.1.1.1 Kultivierung von Bakterien

Bakterienkulturen wurden unter sterilen Bedingungen in Erlenmeyerkolben angezogen. Dafür wurden Zellen aus Dauerkulturen (6.1.1.2) in LB-Medium überimpft und bei 37°C unter guter Belüftung 12 - 16 h inkubiert. Die Resistenzselektion erfolgte, indem die Kultur mit Ampicillin (50 µg/mL) versetzt wurde.

6.1.1.2 Konservierung von Bakterien

Für Dauerkulturen wurden 500 µL einer Bakterienkultur (6.1.1.1) in der spätlogarithmischen Wachstumsphase mit 500 µL 87 % (v/v) Glycerin unter sterilen Bedingungen vermischt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Dauerkultur bei -80°C aufbewahrt.

6.1.2 Parasitologische Arbeiten

6.1.2.1 Kultivierung von Trypanosomenkulturen

Blutstrom-Trypanosomen können in einem axenischem Medium *in vitro* kultiviert werden (Hirumi und Hirumi, 1994). Die Anzucht fand in HMI-9-Medium mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum bei 37°C in 5 % (v/v) CO₂-Atmosphäre statt. Dauerkulturen wurden in 10 ml Zellkulturflaschen durch repetitives Verdünnen auf Konzentrationen $<10^6$ Zellen/mL in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten und zum Animpfen von größeren Zellkulturen verwendet. Größere Zellkulturen wurden in Erlenmeyerkolben bis zu Zelldichten von $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL kultiviert. Das Volumen der Zellkultur sollte dabei $\frac{1}{10}$ des Kolbenvolumens nicht überschreiten, um eine ausreichende CO₂-Versorgung der Zellen zu gewährleisten.

6.1.2.2 Messung von Zelldichten von *T. brucei*-Kulturen

Die Zelldichten von Trypanosomenkulturen wurden über den steigenden elektrischen Widerstand beim Durchgang der Zellen durch eine Kapillare bestimmt. Zur Messung wurden die Zellkulturen direkt vor der Dichtebestimmung in Messlösung auf Zelldichten von ca. 10^3 - 10^4 Zellen/mL verdünnt. Folgende Parameter wurden bei der Messung angelegt: Kapillardurchmesser 60 µm, Messvolumen 400 µL, Größenfenster von 2.5 - 6 µm (Schärfe System, CASY® 1 Model TT).

Messlösung: PBS, 0,02 % (w/v) NaF

6.1.2.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von lebenden Trypanosomenzellen

Biotin-modifizierte Substanzen wurden an Blutstrom-Trypanosomen gebunden und mit Hilfe eines monoklonalen CyTM3-konjugierten α -Biotin-Antikörpers detektiert. Die Färbung von nukleärer und mitochondrialer DNA wurde mit dem membran-permeablen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 erreicht.

Es wurden pro Ansatz $5 \cdot 10^7$ Blutstrom-Trypanosomenzellen durch Zentrifugieren geerntet (10 min, 1500 g). Nach Dekantieren des Mediums wurde das Zellpellet 2 x in je 2 mL PBSG (5.4.2) gewaschen und durch zentrifugieren sedimentiert (2 min, 1000 g). Ein dritter Waschschriff erfolgte in 2 mL Bindepuffer (5.4.2) und das Zellpellet wurde in 100 μ L Bindepuffer resuspendiert. Die Bindung erfolgte nach Zugabe von 250 – 600 ng Biotin-modifizierten Aptamer-Varianten für 1 h bei Raumtemperatur. Ungebundene RNA wurde durch 3 x Waschen in je 2 mL Bindepuffer entfernt und das Zellpellet wurde nach der letzten Zentrifugation in 100 μ L Bindepuffer aufgenommen. Es wurde 1 μ L des CyTM3-konjugierten α -Biotin-Antikörpers sowie 1 μ L einer 50 μ g/mL Hoechst 33342-Lösung hinzugegeben. Nach Inkubation im Dunkeln für 1 h bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut 3x in je 2 mL Bindepuffer gewaschen, und das Zellpellet wurde in 100 μ L Bindepuffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte entweder durch sofortige Mikroskopie der lebenden Zellen oder nach fixieren der Zellen in 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA).

Zum Fixieren wurde die Zellsuspension mit einem äquivalenten Volumen Fixierlösung versetzt und die Zellen mindestens 14 h bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2, Zeiss) mikroskopiert und photographiert (Spot 1.4.1, VisiTron Systems). Die Steuerung der Kamera und die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit dem Programm IPLab, Version 3.9.5 für Mac OS X (Scanalytics).

Die Bindung und Detektion von Quercinsäure erfolgte analog zu den Experimenten mit biotinylierten Aptamer-Varianten, wobei bis zu 170 ng Biotin-modifizierte Quercinsäure (d. h. bis zu 5 μ L des Modifikationsansatzes, siehe Abschnitt 6.6.6) eingesetzt wurde.

Fixierlösung: 8 % (w/v) PFA-Lösung in PBS, pH 7,4

6.1.2.4 Beladung von endozytotischen Kompartimenten mit Dextran

Die Beladung von endozytotischen Kompartimenten mit dem „fluid phase“-Marker Dextran erfolgte angelehnt an die in Engstler *et al.*, 2004 beschriebenen Methode.

Es wurden 10^7 Blutstrom-Trypanosomenzellen durch Zentrifugation geerntet (10 min, 1500 g) und 3 x in je 2 mL PBSG (5.4.2) gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (2 min, 1000 g) wurde das Pellet in 50 μ L einer Lösung von 5 mg/mL Alexa Fluor 488-konjugiertem Dextran (10 kDa) in PBSG aufgenommen. Die Lösung enthielt zusätzlich 50 μ g/mL Hoechst 33342. Die Zellsuspension wurde 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und überschüssiges Dextran wurde durch 3x waschen in je 2 mL PBSG entfernt. Die mit Dextran beladenen Zellen wurden in einem geeigneten Volumen PBSG aufgenommen und zur Visualisierung der Auswirkung des 2-16~GALA-Konjugats auf die endozytotischen Kompartimente der Zelle eingesetzt (siehe Abschnitt 6.1.2.6).

6.1.2.5 Zytotoxizität von membranaktiven Substanzen

Zytotoxizität von PPAS

Das Polymer PPAS (6.6.2) wurde mittels Tropfendialyse gegen dH₂O dialysiert und auf die Pufferbedingungen von PBSG (5.4.2) eingestellt. Es wurden je $1 - 2 \cdot 10^6$ Blutstrom-Trypanosomen in 1 mL PBSG inkubiert, wobei die Ansätzen bis zu 200 µg/mL PPAS enthielten. Die Zellen wurden 90 min bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert und im Anschluss daran 3 x mit je 2 mL PBSG gewaschen. Hierbei wurden die Zellen jeweils für 2 min bei 1000 g sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 50 µL PBSG aufgenommen und der Anteil lebender Zellen mit Hilfe eines fluoreszenz-basierten Nachweissystems (6.7.3) ermittelt.

Zytotoxizität des 2-16~GALA-Konjugats

Das 2-16~GALA-Konjugat (6.5.8) wurde in PBSG (5.4.2) gelöst und auf eine Endkonzentration von 20 µM eingestellt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, indem die Stammlösung bis zu 11 x im Verhältnis 1:2 in PBSG verdünnt wurde. Je 10 µL der Verdünnungen wurden mit 10 µL einer Trypanosomen-Suspension in PBSG versetzt, dabei wurde eine Zelldichte von $5 \cdot 10^7$ Zellen/mL erreicht. Zur Kontrolle wurde statt der Verdünnungen 10 µL PBSG oder 10 µL 100 % EtOH verwendet. Die Ansätze wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss daran der Anteil lebender Zellen mit Hilfe einer fluoreszenzbasierten Methode (6.7.3) ermittelt.

6.1.2.6 Wirkung des 2-16~GALA-Konjugats auf endozytotische Kompartimente

Es wurden $5 \cdot 10^5$ Blutstrom-Trypanosomen eingesetzt, deren endozytotische Kompartimente zuvor mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Dextran beladen wurden (6.1.2.4). Diese wurden in einer 10 µM Lösung des 2-16~GALA-Konjugats in PBSG (5.4.2) aufgenommen (Zelldichte: 10^8 /mL) und 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der gleiche Ansatz wurde ohne Zugabe des Konjugats hergestellt und als Kontrolle mitgeführt. Es wurden im Verlauf der Inkubation Proben entnommen und in 4 % (w/v) PFA in PBS fixiert (siehe Abschnitt 6.1.2.3). Die Proben wurden analysiert und dokumentiert wie in Abschnitt 6.1.2.3 beschrieben.

6.2 Grundlegende Nukleinsäure-Arbeitstechniken

6.2.1 Reinigung und Isolierung von Nukleinsäuren

6.2.1.1 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Durch die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln werden in der Nukleinsäurelösung vorhandene Proteine entfernt, indem diese denaturiert werden und sich nach der Extraktion in der Phasengrenzschicht zwischen beiden Lösungsmitteln befinden.

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit gleichem Volumen äquilibriertem Phenol versetzt. Nach Emulgieren der beiden Phasen wurden diese durch Zentrifugation

getrennt (5 min, 14000 g, 4°C) und die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde analog mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt und die Nukleinsäurelösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

6.2.1.2 Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Nukleinsäuren besitzen die Eigenschaft, in Gegenwart von monovalenten Kationen in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag zu bilden. Durch die Veränderung der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und der Verringerung der effektiven negativen Ladung der Nukleinsäure durch die Erhöhung der Salzkonzentration sowie Erniedrigung des pH-Wertes kommt es zur Aggregation der Nukleinsäuren, die durch ein Herabsetzen der Temperatur unterstützt wird.

Nukleinsäurelösungen wurden mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4,8 und weiteren 2,2 – 2,5 Volumen vorgekühltem Ethanol (100 %, -20°C) gemischt. Nach einer Inkubation bei -20°C (20 min) wurden die Nukleinsäuren sedimentiert (20 min, 14000 g, 4°C) und mit einem Volumen eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 14000 g, 4°C) wurden die Nukleinsäuren in TE, pH 7,5 oder entionisiertem Wasser aufgenommen.

6.2.1.3 Gelreinigung von Nukleinsäuren

Polyacrylamidgele:

RNA-Moleküle wurden in denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch separiert (6.2.2.2) und durch Autoradiographie detektiert (6.2.2.4). Die Isolierung der RNA-Fragmente erfolgte durch Ausschneiden des entsprechenden Gelabschnittes. Die RNA wurde durch Inkubation der Gelstücke in mehr als 5 Volumen TE, pH 7,5 unter ständigem Invertieren (4 h - 16 h, 37°C) eluiert. Die eluierte RNA wurde wie in 6.2.1.1 beschrieben gereinigt und mit Ethanol präzipitiert (6.2.1.2).

Agarosegele:

RNA-Moleküle sowie RNA-Konjugate wurden in Agarosegelen separiert (6.2.2.3) und durch Ethidiumbromidfärbung visualisiert (6.2.2.4). Der Bereich des Gels, der das RNA-Molekül mit der gewünschten Größe enthielt wurde ausgeschnitten und in flüssigem N₂ schockgefroren. Nach dem Auftauen konnten flüssige Gelbestandteile zusammen mit der gelösten RNA durch Zentrifugation durch eine Glaswollschicht von Agaroseresten getrennt werden. Die RNA-enthaltene wässrige Lösung wurde wahlweise über Gelfiltration gereinigt (6.2.1.4) und mit EtOH (6.2.1.2) gefällt.

6.2.1.4 Entfernung niedermolekularer Verbindungen durch Gelfiltration

Für die Entfernung niedermolekularer Substanzen aus Nukleinsäurelösungen wurde das Prinzip der Gelfiltration auf der Basis von quervernetztem Dextran (Sephadex G50 *Fine*) als Säulenmatrix angewendet. Das Säulenmaterial wurde vor der Benutzung in entionisiertem Wasser oder TE, pH 7,5 für 4-16 h aufgeschwemmt.

Die Verengung einer Pasteurpipette wurde mit einer Glaskugel (Durchmesser 4 mm) blockiert und die Pipette wurde mit dem äquilibrierten Säulenmaterial befüllt. Die

Probe wurde auf die Säule geladen und fraktionell mit dem entsprechenden Puffer eluiert. Die Nukleinsäuren wurden bei Bedarf mit Ethanol präzipitiert (6.2.1.2).

6.2.2 Analyse und Detektion von Nukleinsäuren

6.2.2.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen erfolgte UV-spektroskopisch und basiert auf dem gemittelten Absorptionsmaximum der Basen bei einer Wellenlänge von 260 nm und dem Lambert Beer'schen Gesetz

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

(A: Absorption als Quotient der eingestrahlten und transmittierten Lichtintensität; ϵ : molarer Extinktionskoeffizient; c: molare Konzentration; d: Schichtdicke der absorbierenden Flüssigkeit)

Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer Massenkonzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA. Für RNA-Moleküle wurde der Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge von 260 nm nach dem nearest neighbour-Modell berechnet (Cantor et al. 1970). Die Reinheit der Lösungen wurde über ein Absorptionsspektrum im Bereich von 210 bis 350 nm analysiert. Dabei wiesen Werte < 1,8 für den Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ auf Verunreinigungen mit Phenol bzw. Proteinen hin.

6.2.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch separiert. Dabei wurden Gele mit Konzentrationen von 8 % - 15 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) verwendet. Als denaturierendes Agens enthielten die Gele sowie der Auftragspuffer 8 M Harnstoff.

Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in Auftragspuffer hitzedenaturiert (5 min, 95°C) und elektrophoretisch bei konstanter Leistung von 20 W bis 45 W separiert. Als Größenstandard wurden im Fall von radioaktiv markierter RNA wahlweise radioaktiv markierte Oligoribonukleotide nach einer alkalischen Hydrolyse (6.5.2) verwendet. Zur gleichmäßigen Wärmeableitung dienten Aluminiumplatten. Die Gele wurden entweder gefärbt oder im Fall von radioaktiv markierten Nukleinsäuren auf Whatman-Papier getrocknet. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte gemäß 6.2.2.4 durch Färbung mit SYBR Green II oder Autoradiographie.

Geldimensionen: 200 mm Breite, 200 mm – 400 mm Länge, 0,4 mm Tiefe.

Gelzusammensetzung: TBE (5.4.2), 8 % - 15 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 8 M Harnstoff. Die Polymerisation erfolgte mit 0,06 % (w/v) Ammoniumpersulfat und 0,06 % (v/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin).

Laufpuffer: TBE

Auftragspuffer: TBE, 8 M Harnstoff, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol.

6.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden in Auftragspuffer aufgenommen und in einem 1 % - 2 % (w/v) Agarosegel in TBE (5.4.2) mit 7 V/cm für 1 h – 3 h elektrophoretisch separiert. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe von Ethidiumbromid (6.2.2.4).

Es wurden 1 % - 2 % (w/v) Agarose in TBE aufgekocht und unter Rühren abgekühlt. Vor dem Gelieren der Agarose wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/mL der Gellösung beigemischt.

Geldimension: 80 mm x 100 mm x 5 mm bis 140 mm x 140 mm x 5 mm

Laufpuffer: TBE

Auftragspuffer: TBE, 6,5 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (w/v) Xylencyanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau.

6.2.2.4 Detektion von Nukleinsäuren

Ethidiumbromid:

Die Detektion von Nukleinsäuren in Agarosegelen (6.2.2.3) erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge $\lambda = 254$ nm). Dabei werden Ethidiumbromid-Moleküle, die in die gestapelten Basen von DNA oder RNA interkalieren bzw. aufgrund ihrer kationischen Eigenschaften an das Phosphatrückgrat binden zu einer sichtbaren Fluoreszenz ($\lambda = 560$ nm) angeregt.

SYBR Green II:

RNA wurde in Polyacrylamid- oder Agarosegelen (6.2.2.2, 6.2.2.3) mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green II (Excitationsmaximum: 492 nm, Emissionsmaximum 513 nm) detektiert. Dazu wurden die Gele 15 min in Färbelösung inkubiert. Die Detektion der RNA erfolgte mit dem Fluoro Image Analyzer FLA-5000 (FujiFilm) durch Anregung des Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 473 nm. Die Fluoreszenz wurde über einen monochromatischen Filter ($\lambda = 510$ nm) mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die Visualisierung und Evaluation der Signale erfolgte unter Anwendung der Software Image Gauge 4.23 (FujiFilm).

Färbelösung: SYBR Green II wurde 1:10000 in TBE (5.4.2) verdünnt.

Autoradiographie:

Nach der Auftrennung radioaktiv markierter Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen (6.2.2.2) wurden die Gele auf Whatman-Papier transferiert, mit einer Kunststoffolie bedeckt und vakuumgetrocknet. Die getrockneten Gele wurden mit einer Imaging Plate (IP, FujiFilm) in einer Filmkassette exponiert (RT/30 min – 3 Tage). Das Auslesen und die Auswertung der IP erfolgten wie bereits für SYBR[®]Green II beschrieben, jedoch mit abweichenden Wellenlängen bei der Excitation ($\lambda = 632$ nm) und der Detektion ($\lambda = 390$ nm). Im Fall einer Geleleution wurde das Gel gegen röntgensensitive Filme in einer Filmkassette exponiert (RT, 5 - 30 min) und die Filme wurden in einem automatisierten Verfahren chemisch entwickelt.

6.2.2.5 Szintillationsmessung

Lösungen mit radioaktiv markierten Nukleinsäuren (6.4.2) wurden mit 2 mL Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint[®], Roth) gemischt. Die Proben wurden maximal 2 min im Szintillationszähler gemessen. Die Messung wurde vorzeitig abgeschlossen, wenn eine Standardabweichung der Messwerte von weniger als 2 % erreicht wurde.

6.3 DNA-Arbeitstechniken

6.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen wurde das „*Plasmid Maxi Kit*“ der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben angewendet. Die Methode basiert auf der alkalischen Detergenzlyse nach Birnboim und Doly (1979).

Es wurden 300 mL einer stationären Bakterienkultur (6.1.1.1) sedimentiert und unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert. Durch rasche Neutralisation mit KOH präzipitieren die Proteine und chromosomale DNA mit dem schwerlöslichen Kaliumsalz des Detergenz. Durch Sedimentation werden diese von der gelösten Plasmid-DNA getrennt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch die Bindung an eine Silica-Membran und das Waschen mit ethanolhaltigem Puffer. Die gereinigte Plasmid-DNA wird von der Membran mit einem Niedrigsalzpuffer im leicht alkalischen pH eluiert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsverdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (6.3.2) zur Verwendung als DNA-Vorlage in *run off in vitro* Transkriptionen weiter verarbeitet.

6.3.2 Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA

Plasmide können durch Restriktionsendonukleasen hydrolysiert bzw. im Fall von singulären Schnittstellen linearisiert und damit für eine „run off“ *in vitro* Transkription (6.4.1) eingesetzt werden. Hierfür wurden 100 – 500 µg Plasmid-DNA mit 0,8 U/µg DNA durch *EcoRI* in dem entsprechenden Restriktionspuffer hydrolysiert, wobei das eingesetzte Volumen des Enzyms maximal 1/10 des Reaktionsvolumens betrug. Restriktionsansätze wurden bis zu 2 h - 4 h bei 37°C inkubiert. Die Entfernung von Proteinen erfolgte nach Abschnitt 6.2.1.1 und darauffolgender EtOH-Präzipitation (6.2.1.2). Die Linearisierung der Plasmide wurde mittels 1 %-igen (w/v) Agarosegelen (6.2.2.3) überprüft.

***EcoRI*-Restriktionspuffer:** 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTE

6.4 RNA-Arbeitstechniken

6.4.1 Synthese von RNA-Molekülen durch T7-Transkription

6.4.1.1 Unmodifizierte RNA:

Die „run off“ *in vitro* Transkription der RNA erfolgte mit Hilfe der DNA-abhängigen T7-RNA-Polymerase (Milligan *et al.*, 1987) und wurde mit linearisierten Plasmiden als Transkriptionsmatrizen durchgeführt. Die Transkription von unmodifizierter RNA erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 0,5 – 2 mL unter Verwendung von 50 µg/mL DNA-Vorlage, 1 mM NTPs, 80 U/mL RNasin und 400 – 800 U/mL T7-RNA-Polymerase in Reaktionspuffer. Nach einer Inkubation von 2 h – 4 h wurde die DNA durch Zugabe von 2 U DNaseI (RNase frei) pro µg DNA-Vorlage (20 min, 37°C) degradiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte durch Extraktion mit Phenol (6.2.1.1) und durch eine nachfolgende Gelfiltration (6.2.1.4). Die Nukleinsäuren wurden mit Ethanol präzipitiert (6.2.1.2) und in TE, pH 7,5 oder entionisiertem Wasser aufgenommen.

Reaktionspuffer: 40 mM Tris/HCl, pH 7,4; 12 mM MgCl₂; 4 mM DTT; 1 mM Spermidin; 0.002 % (v/v) Triton X-100.

6.4.1.2 2'-modifizierte RNA:

Die Synthese von 2'-modifizierten RNA-Molekülen erfolgte analog zur Synthese unmodifizierter RNA unter der Verwendung von je 1 mM 2'-F- oder 2'-NH₂-substituierten 2'-Desoxy-Pyrimidinnukleosidtriphosphaten, sowie je 1 mM ATP und GTP. Es wurde eine mutierte Form der T7-Polymerase verwendet, die durch eine Substitution von Tyrosin an der Position 639 nach Phenylalanin (Y639F) eine veränderte Substratspezifität besitzt. Damit weist sie eine höhere Transkriptionseffizienz mit 2'-substituierten NTPs auf als die Wildtyp Polymerase (Padilla und Sousa, 1999). Es wurden Transkriptionsansätze von 10 µL – 20 µL hergestellt und 5 - 8 h bei 37°C inkubiert. Die Hydrolyse durch DNaseI und die Reinigung der RNA erfolgte wie in Abschnitt 6.4.1.1 beschrieben. Die gereinigten modifizierten RNA-Spezies wurden wahlweise dephosphoryliert (6.5.1) und endständig radioaktiv markiert (6.4.2.2).

6.4.1.3 Biotin-modifizierte RNA

Zur internen Markierung von unmodifizierter und 2'-modifizierter RNA wurden analog zu den Abschnitten 6.4.1.1 und 6.4.1.2 „run off“ *in vitro* Transkriptionsansätze mit einem Volumen von 20 µL hergestellt, die ein Biotin-modifiziertes Nukleotid-Analogon enthielten. Im Fall der unmodifizierten RNA wurde in Gegenwart von 200 µM UTP sowie 10 µM Biotin-16-UTP transkribiert. Ansätze zur Synthese von 2'-modifizierter RNA enthielten 200 µM ATP sowie 10 µM Biotin-11-ATP. Die Inkubation und Reinigung erfolgte analog zu den Abschnitten 6.4.1.1 und 6.4.1.2.

6.4.2 Methoden zur radioaktiven Markierung von RNA-Molekülen

6.4.2.1 Interne radioaktive Markierung

Für die interne radioaktive Markierung der RNA wurde die Transkriptionsreaktion gemäß Abschnitt 6.4.1.1 bzw. 6.4.1.2 in einem Reaktionsvolumen von 20 µL durchgeführt, mit den folgenden Abweichungen: Es wurden 50 U T7-RNA-Polymerase bzw. eine äquivalente Menge der T7-Y639F-Mutante sowie eine abweichenden ATP-Konzentration von 50 µM eingesetzt. Zusätzlich wurden 50 µCi [α -³²P]-ATP (spez. Aktivität: 3000 Ci/mmol, Volumenaktivität: 10 µCi/µL) eingesetzt. Nach einer Inkubation von 1h (unmod. RNA) - 8 h (2'-mod. RNA) bei 37°C wurde die DNA-Vorlage nach Zugabe von 20 µL 20 mM MgCl₂ und 10 U DNaseI (RNase frei) für 20 min bei 37°C degradiert. Die Reinigung der radioaktiv markierten Nukleinsäuren erfolgte analog zu Abschnitt 6.4.1.1. Die RNA wurde wahlweise direkt eingesetzt oder mit Hilfe eines denaturierenden 8 % (w/v) PAA-Gels (6.2.2.2) aufgetrennt aus dem Gel gereinigt (6.2.1.3).

6.4.2.2 Terminale radioaktive Markierung

3'-terminale Markierung:

Für eine Markierung des 3'-Terminus wurde die zu markierende RNA in einer Ligasereaktion mit 3',5'-[³²P]-CDP modifiziert. Hierbei katalysiert die T4-RNA-Ligase

die ATP-abhängige kovalente Verknüpfung einer 5'-Phosphat-terminierten Donor-RNA und einem 3'-Hydroxyl-terminierten Akzeptor-RNA (England *et al.*, 1980).

In einem Reaktionsvolumen von 20 µL wurden bis zu 400 pmol RNA mit 10 - 50 µCi 3',5'-[³²P]-CDP (spez. Aktivität: 3000 µCi/mmol) und 10 U T4-RNA-Ligase Roche im Ligationspuffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der markierten Nukleinsäuren erfolgte wie unter 6.4.2.1 beschrieben. Die Markierung wurde durch elektrophoretische Auftrennung der RNA (6.2.2.2) überprüft.

Ligationspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 300 mg/L BSA

5'-terminale Markierung:

Das Enzym T4-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert die kovalente Übertragung einer γ-Phosphatgruppe von ATP auf die terminale, freie 5'-Hydroxylgruppe von Oligonukleotiden (Richardson, 1971).

Die Kinasierung erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20 - 50 µL in Kinasierungspuffer mit 35 - 70 pmol 5'-dephosphorylierter RNA (6.5.1) und 10 U T4-PNK. Zusätzlich wurden 50 µCi γ-[³²P]-ATP (spez. Aktivität: 3000 Ci/mmol) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der markierten Nukleinsäuren erfolgte wie unter 6.4.2.1 beschrieben, wobei die RNA-Präparationen immer durch Gelelektion (6.2.1.3) gereinigt wurden.

Kinasierungspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM Na₂EDTA.

6.4.3 Schmelzkurven

Das Schmelzverhalten von RNA-Molekülen wurde mittels Hyperchromizitätsmessungen in einem UV-Vis-Spektrophotometer mit integrierter steuerbarer Temperatureinheit analysiert (Cary 100, Varian Inc.). In einer schwarzen Quarzküvette mit Teflonstopfen wurden 500 µL einer 10 - 20 µg/mL RNA-Lösung in 50 mM Natriumcacodylat, pH 6,5 vorgelegt. Die RNA-Lösung enthielt im Fall von unmodifizierten RNA-Präparationen 50 mM NaCl und 0,5 mM MgCl₂, die Analyse fand im Fall von 2'-modifizierten RNA-Präparationen in Abwesenheit von zusätzlichen mono- und bivalenten Salzen statt. Bei einer konstanten Wellenlänge von 260 nm wurden Schmelzkurven in einem Temperaturbereich von 20 - 95°C bei einer Heizrate von 1 oder 2°C/min aufgezeichnet, wobei alle 0,1°C ein Datenpunkt aufgenommen wurde.

Zur Auswertung wurde die Hyperchromizität nach der folgenden Gleichung berechnet (Hung *et al.*, 1994):

$$\text{Hyperchromizität (\%)} = 100 \cdot \frac{A_{260\text{nm}}(95^\circ\text{C}) - A_{260\text{nm}}(20^\circ\text{C})}{A_{260\text{nm}}(20^\circ\text{C})}$$

Thermodynamische Parameter wurden mit Hilfe der Cary WinUV Thermal Software (Varian Inc.) analysiert: Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte anhand der ersten Ableitung der Schmelzkurven bei 0,5·ΔA₂₆₀ nm. Werte für ΔH und ΔS wurden mittels van't Hoff Auftragung ermittelt und zur Berechnung der freien Gibb'schen Energie eingesetzt (ΔG = ΔH - T·ΔS; T = 298 K).

6.5 Modifikation von RNA-Molekülen

6.5.1 Dephosphorylierung von RNA-Molekülen

Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIAP, "calf intestine alkaline phosphatase") katalysiert die Hydrolyse von 5'- und 3'-terminalen Phosphatgruppen von RNA und DNA. Diese Reaktion wurde zur Vorbehandlung von RNA-Molekülen verwendet, die am 5'-Ende mit [^{32}P] markiert werden sollten.

Es wurde 35-70 pmol RNA und 5 U CIAP in Dephosphorylierungspuffer für 1 h bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem der Ansatz mit Phenol/Chloroform extrahiert wurde (6.2.1.1). Die RNA wurde durch EtOH präzipitiert (6.2.1.2) und zur 5'-terminalen radioaktiven Markierung eingesetzt (6.4.2.2).

Dephosphorylierungspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5; 1 mM Na_2EDTA

6.5.2 Limitierte alkalische Hydrolyse von RNA-Molekülen

Zur Herstellung eines Größenstandards („OH⁻-Leiter“) wurden 5'-terminal radioaktiv-markierten RNA-Präparationen (6.4.2.2) unter alkalischen Bedingungen partiell hydrolysiert. Unter idealen Bedingungen erhält man eine gleichmäßige statistische Verteilung von radioaktiv markierten RNA-Fragmenten über die gesamte Länge des Moleküls. In einem Reaktionsvolumen von 50 μL wurden 1 pmol - 10 pmol radioaktiv markierte Oligoribonukleotide (ca. 100000 cpm) in Hydrolysepuffer bei 95°C für 20 min inkubiert und anschließend über Gelfiltration gereinigt (6.2.1.3) sowie durch EtOH gefällt (6.2.1.2). Unter denaturierenden Bedingungen wurden je 10000 cpm in 15 % (w/v) Polyacrylamidgelen elektrophoretisch separiert (6.2.2.2).

Hydrolysepuffer: 50 mM $\text{Na}_x\text{H}_y\text{CO}_3$ (pH 9,2), 1 mM Na_2EDTA .

6.5.3 Enzymatische Hydrolyse von RNA-Molekülen

Die Endoribonuklease RNase T1 katalysiert die Hydrolyse von einzelsträngiger RNA spezifisch zwischen dem 3'-Phosphat von Guanin zum 5'-OH des benachbarten Nukleotides (Uchida und Egami, 1971). Eine Unterscheidung von einzelsträngig und doppelsträngig vorliegenden Bereichen wird so möglich.

Zur Strukturanalyse von unmodifizierten und 2'-modifizierten RNA-Varianten wurden 60 – 750 pmol 5'-terminal ^{32}P -markierte RNA (6.4.2.2) in 20 μL PBS vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 2 U RNase T1 gestartet. Die Inkubation erfolgte bis zu 10 min bei 37°C, wobei den Ansätzen im Verlauf der Inkubation Zeitproben entnommen wurden. Die Analyse der Proben erfolgte durch denaturierende 15 % (w/v) Polyacrylamidelektrophorese (6.2.2.2) und Autoradiographie (6.2.2.4) wobei anhand des entstehenden Bandenmusters die Kinetik der enzymatischen Spaltung visualisiert wurde.

6.5.4 Chemische Hydrolyse von RNA-Molekülen

Bei der chemischen Hydrolyse von RNA-Molekülen, dem sogenannten „inline probing“ macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass RNA-Moleküle in Gegenwart bivalenter Kationen, meist Mg^{2+} , internen Transesterifizierungsreaktionen unterliegen (Soukup und Breaker, 1999; Winkler *et al.*, 2002). Die Geschwindigkeit dieser Reaktion hängt

von der Konformation der die Spaltstelle umgebenden Nukleotide ab und liefert deshalb Informationen über die strukturellen Eigenschaften des betreffenden Nukleinsäurefragments.

Es wurden 8 – 60 fmol 5'-terminal ^{32}P -markierte RNA (6.4.2.2) in einem 20 μL Ansatz in „inline probing“-Puffer inkubiert, wobei dieser mit 10 ng/ μL tRNA (Hefe) supplementiert wurde. Der Ansatz wurde bis zu 48 h bei Raumtemperatur inkubiert, wobei im Verlauf der Inkubation Zeitproben entnommen wurden. Diese wurden mit TE pH 7,5 auf 50 μL Endvolumen aufgefüllt und durch EtOH präzipitiert (6.2.1.2). Die Analyse der Zeitproben erfolgte mittels denaturierender 15 % (w/v) Polyacrylamid-gelelektrophorese und nachfolgender Autoradiographie. Die Kinetik der chemischen Spaltung wurde mit Hilfe der Software Image Gauge 4.23 (FujiFilm) densitometrisch quantifiziert.

„inline probing“-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,3; 20 mM MgCl_2 ; 100 mM KCl

6.5.5 Oxidation von RNA-Molekülen

Die 3'-terminale Oxidation von RNA Molekülen kann durch die Behandlung mit Natriumperiodat unter sauren Bedingungen erfolgen (Odom *et al.*, 1980; Czworkowski *et al.*, 1991).

Es wurden bis zu 300 μg RNA in 100 μL Oxidationspuffer gelöst und 70 μL einer wässrigen 20 mM NaIO_4 -Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde 4 – 16 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die RNA wurde durch Gelfiltration mittels in entionisiertem Wasser aufgeschwemmten Sephadex G50 Säulenmaterial gereinigt (6.2.1.4), wobei überschüssiges NaIO_4 mit den Zuckereinheiten des Säulenmaterials abreagierten. Die RNA wurde durch EtOH gefällt (6.2.1.2) und in entionisiertem Wasser aufgenommen.

Oxidationspuffer: 50 mM Natriumazetat, pH 4,5; 10 mM MgCl_2 ; 100 mM NaCl

6.5.6 Modifikation von RNA durch Polyethylenglycol-Derivate

Es wurden Polyethylenglycol-Derivate (mPEG-NH₂) verwendet, die eine terminale primäre Aminogruppe tragen und in einer N-ethyl-N'-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC)-medierten Reaktion mit dem 5'-Phosphat Ende der RNA verknüpft (Chu *et al.*, 1983). Diese konnten im Fall der mPEG-NH₂-Präparationen mit durchschnittlichen molekularen Massen von 10 kDa (mPEG₁₀₀₀₀) und 20 kDa (mPEG₂₀₀₀₀) kommerziell erworben werden (Sigma). Im Fall von mPEG-NH₂ mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 5 kDa (mPEG₅₀₀₀) wurde die terminale Aminogruppe durch terminale Oxidation und Spermin-Modifikation wie in Abschnitt 6.6.5 hergestellt.

Zur kovalente Verknüpfung von Spermin-mPEG₅₀₀₀ mit dem 5'-Phosphat Ende der RNA wurde 1,25 mg EDC in 5 μL einer 200 μM RNA-Lösung aufgenommen und mit einem gleichen Volumen einer Spermin-mPEG₅₀₀₀-Lösung in 100 mM Imidazol, pH 6 aufgenommen. Alternativ wurden 1 nmol RNA in 20 μL einer 10 mM mPEG₁₀₀₀₀- bzw. mPEG₂₀₀₀₀-Lösung in 100 mM Imidazol pH 6 aufgenommen. Nach Zentrifugation (5 min, 21000 g) wurden dem Überstand zusätzlich 10 μL 100 mM Imidazol pH 6 hinzugefügt und die Ansätze wurden 14 – 16 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie, indem die modifizierte RNA an eine in TE, pH 7,5 äquilibrierte DEAE-Matrix gebunden wurde (DEAE BioGel® Agarose, BioRad). Nachdem ungebundene mPEG-Derivate durch Waschen mit TE, pH 7,5 entfernt wurden, konnte die modifizierte RNA durch 600 mM NaCl in TE pH 7,5 eluiert und durch EtOH (6.2.1.2) gefällt. ^{32}P -markierte PEGylierte

RNA-Präparationen wurden analog zu der hier beschriebenen Methode hergestellt, indem 1 pmol intern ^{32}P -markierte RNA verwendet wurde.

6.5.7 Modifikation von Aptamer 2-16 durch Melittin

Aptamer 2-16 wurde wie in Abschnitt 6.5.5 beschrieben am 3'-Ende durch NaIO_4 oxidiert. Für die Verknüpfung mit Melittin bzw. mit durch PMA maskiertem Melittin (siehe Abschnitt 6.6.4) wurden 2 μM oxidierte RNA mit einem 100-fachen molaren Überschuss an Melittin bzw. maskiertem Melittin inkubiert. Analytische Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 – 50 μL durchgeführt, für präparative Reaktionen wurde bis zu 1 mL angesetzt. Die Reaktion fand in einem Reaktionspuffer bestehend aus 50 mM NaCNBH_3 in PBS pH 8 statt. Der Ansatz wurde 14 – 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Lösliche und unlösliche Bestandteile des Ansatzes wurden durch Zentrifugation (10 min, 21000 g) getrennt und auf denaturierenden Polyacrylamidgelen (6.2.2.2) analysiert.

6.5.8 Modifikation von Aptamer 2-16 durch GALA

Aptamer 2-16 wurde wie in Abschnitt 6.5.5 beschrieben am 3'-Ende durch NaIO_4 oxidiert. Die Verknüpfung mit GALA erfolgte durch reduktive Aminierung. Es wurden 2 μM 3'-oxidierte RNA in einem 500- bis 1000-fachen molaren Überschuss an GALA inkubiert. Die Reaktion wurde in PBS pH 7,4 mit 0,5 - 1 M KCl und 50 mM NaCNBH_3 bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach 14 – 16 h wurde nicht-verknüpftes GALA durch Gelfiltration abgetrennt (6.2.1.4) und lyophilisiert. Die RNA-haltigen Fraktionen wurden durch EtOH gefällt (6.2.1.2) und in 2 %-igen (w/v) Agarosegele (6.2.2.3) separiert. Das 2-16~GALA-Konjugat wurde von nicht-verknüpfter RNA durch Gelreinigung (6.2.1.3) abgetrennt und durch EtOH präzipitiert (6.2.1.2).

6.6 Organisch-chemische Synthesen und Modifikationen

6.6.1 Synthese von Poly(Lysin Dodecanamid)

Poly(Lysin Dodecanamid) wurde durch Grenzflächenpolymerisation aus L-Lysin und Dodecandisäuredichlorid hergestellt (Eccleston *et al.*, 1999; Eccleston *et al.*, 2000). In einer typischen Polymerisierungsreaktion wurden 0,02 mol L-Lysin·HCl, 0,16 mol K_2CO_3 und 0,135 mol KCl in 100 mL entionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde in einen Mixer gegeben und bis zur Bildung von Eiskristallen abgekühlt. 0,02 mol Dodecandisäuredichlorid wurde in 100 mL eisgekühltem CHCl_3 gelöst und zur wässrigen Diaminlösung hinzugegeben. Die Mischung wurde 30 Minuten bei höchster Umdrehungszahl des Mixers emulgiert. Die Emulsion wurde mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 600 mL verdünnt und das organische Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer entfernt. Der wässrige Rückstand wurde in einer Rührzelle mit einer YM3-Membran entsalzt und auf ein Volumen von 50 mL konzentriert. Das Konzentrat wurde mit HCl auf pH 4 angesäuert. Das entstehende Präzipitat wurde durch Zentrifugation isoliert und im Vakuum getrocknet. Die Polymerisation wurde mittels H^+ -NMR-Analyse des Produkts im Vergleich zu den H^+ -NMR-Spektren der Edukte überprüft.

6.6.2 Synthese von Poly(2-Propylacrylsäure)

Das Monomer 2-Propylacrylsäure wurde in einer mehrstufigen Synthese hergestellt (Ferrito und Tirrell, 1992; Murthy *et al.*, 1999), wobei die Produkte der Synthesestufen durch H^+ -NMR-Analysen überprüft wurden.

1. Synthese von 2-Carboethoxypentylsäure:

0,5 mol Diethylpropylmalonat wurde in 700 mL einer 1 M KOH-Lösung in 95 % (v/v) EtOH gelöst und 18 h bei Raumtemperatur sowie 25 h bei 4°C gerührt. Das organische Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer entfernt. Der ölige Rückstand wurde in wenigen mL entionisiertem Wasser gelöst und mit 1 M HCl auf pH 2 angesäuert, was zur Phasentrennung eines wässrigen und eines organischen Anteils führte. Die wässrige Lösung wurde im Scheidetrichter von der öligen Phase getrennt und 3x mit je 200 mL Diethylether extrahiert. Die Etherextrakte wurden mit der öligen Phase vereinigt und über $MgSO_4$ getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum abgedampft, und das zurückgebliebene gelbliche Öl wurde gesammelt. Es konnten 83,4 g, d.h. 0,48 mol ungereinigtes Produkt gewonnen werden, was einer Ausbeute von 96 % entsprach.

2. Synthese von Ethyl-2-Propylacrylsäure

0,48 mol 2-Carboethoxypentylsäure wurde auf -5°C gekühlt, bevor 0,53 mol Diethylamin hinzugegeben und 0,54 mol Formaldehyd tropfenweise hinzugefügt wurde. Die Mischung wurde 24 h bei Raumtemperatur sowie darauf folgend weitere 8 h bei 60°C unter Rückflusskühlung gerührt. Die Mischung wurde danach auf 0°C abgekühlt und mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt bis die daraus resultierende Gasbildung beendet war. Der Reaktionsansatz wurde mit 3x mit je 200 mL Diethylether extrahiert und die vereinigten Etherextrakte über $MgSO_4$ getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer entfernt. Es blieben 32 g eines gelblichen Öls zurück, was 0,23 mol des ungereinigten Produktes Ethyl-2-Propylacrylsäure und damit einer Ausbeute von 48 % entsprach.

3. Synthese von 2-Propylacrylsäure

Es wurden 10 g d.h. 0,07 mol Ethyl-2-Propylacrylat mit 175 mL wässriger 1 M KOH versetzt und 24 h unter Rückfluss gerührt. Das Gemisch wurde danach mit HCl auf pH 2 angesäuert und das entstehende Öl von der wässrigen Phase separiert. Die wässrige Lösung wurde 4 x mit je 200 mL Diethylether extrahiert und die mit der organischen Phase vereinigten Etherextrakte über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Abdampfen des organischen Lösungsmittel blieben 6,3 g eines gelblichen Öls zurück, das bei 86°C und 7 mbar zu 5,9 g eines farblosen Öls destilliert wurde. Dies entspricht 0,05 mol 2-Propylacrylsäure und damit einer Ausbeute von 71 %.

4. Radikalische Polymerisation von Poly(2-Propylacrylsäure)

Es wurden 2 g 2-Propylacrylsäure mit 2 mol% Azobisisobutyronitril (AIBN) sowie wahlweise 4 mol% Cysteamin versetzt und im Vakuum entgast. Die Polymerisation wurde 12 h bei 60°C durchgeführt. Das Polymer wurde durch Zugabe von Ethylacetat präzipitiert, filtriert und im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Polymer wurde in Methanol gelöst und erneut in einem Überschuss von Diethylether präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch filtrieren isoliert und im Vakuum getrocknet. Es konnten auf diese Weise 130 mg Poly(2-Propylacrylsäure) generiert werden.

Die Polymerpräparation wurde in 0,1 M NaOH gelöst und durch Dialyse auf die gewünschten Pufferbedingungen eingestellt.

6.6.3 Synthese von 2-Propionsäure-3-Methylmaleinsäureanhydrid

Das disubstituierte Maleinsäureanhydrid Derivat 2-Propionsäure-3-Methylmaleinsäureanhydrid (PMA) wurde synthetisiert, indem zunächst 2-Propionsäure-3-Methylmaleinsäure synthetisiert wurde, die unter Wasserabspaltung zum entsprechenden Säureanhydrid konvertiert werden konnte (Rozema *et al.*, 2003; Naganawa *et al.*, 1994).

25 mmol NaH wurden in 50 mL Tetrahydrofuran (THF) suspendiert und 30 mmol Triethyl-2-Phosphonopropionat wurden hinzugegeben. Nachdem die daraus resultierende Entwicklung von H₂-Gas abgeklungen war, wurde der nun klaren Lösung 20 mmol Dimethyl-2-oxoglutarat in 10 mL THF zugefügt. Das Gemisch wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor 10 mL entionisiertes Wasser hinzugegeben und das THF im Rotationsverdampfer entfernt wurde. Der Rückstand wurde mit 3 x 50 mL Diethylether extrahiert, die Etherextrakte vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum abgedampft wobei eine ölige Flüssigkeit zurückblieb. Diese wurde durch Kieselgelchromatographie gereinigt, wobei die Elution mit Diethylether:Hexan (2:1) erfolgte. Nach Entfernen der organischen Lösungsmittel im Rotationsverdampfer führte dies zu 3,1 g eines Triester-Intermediats. Dieses Zwischenprodukt wurde in 50 mL 50 % (v/v) EtOH aufgenommen, mit 4,5 g KOH versetzt und 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abdampfen von EtOH im Vakuum wurde der Rückstand mit HCl auf pH 2 angesäuert und mit 200 mL Ethylacetat extrahiert. Dies wurde über MgSO₄ getrocknet und zu einem weißen Feststoff konzentriert. Umkristallisieren mit Dichlormethan und Hexan lieferte 540 mg PMA, was durch ¹H-NMR-Analyse überprüft wurde.

PMA wurde in 100 % EtOH gelöst und zur Maskierung der primären Aminogruppen von Melittin verwendet (6.6.4).

6.6.4 Maskierung der primären Aminogruppen von Melittin

Primäre Aminogruppen können durch bisubstituierte Maleinsäureanhydrid-Derivate in pH-abhängiger Weise reversibel modifiziert werden (Rozema *et al.*, 2003). Es wurden 1 mM Melittin mit einem 1- bis 10-fachen molaren Überschuss an PMA (6.6.3) in Maskierungspuffer für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden für analytische Zwecke nicht gereinigt, sondern direkt für die Quantifizierung primärer Aminogruppen (6.7.4) oder Verknüpfungsreaktionen mit Aptamer 2-16 (6.5.7) eingesetzt. Für präparative Verknüpfungsansätze wurde überschüssiges PMA entfernt, indem der Ansatz 2 x 3 h gegen PBS pH 8 dialysiert wurde, wobei eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgröße von 1000 Da verwendet wurde.

Maskierungspuffer: 50 mM HEPES, 62,5 mM NaOH, 50 % (v/v) EtOH

6.6.5 Terminale Oxidation von Monomethoxypolyethylenglycol und Modifikation durch Spermin

Monomethoxypolyethylenglycol (mPEG) mit einer durchschnittlichen molekularen Masse von 5 kDa wurde mittels der Moffat-Reaktion oxidiert, was zur Bildung einer terminalen Aldehyd-Funktion führte (Chamow *et al.*, 1994). Es wurden 10 g mPEG (≈ 2 mmol) mit 10 mL DMSO auf 50 – 60°C bis zur Bildung einer homogenen Lösung erwärmt. Nach Abkühlen wurde die Lösung zu einem Gemisch aus 3 mL Essigsäureanhydrid und 10 mL DMSO gegeben. Die Mischung wurde zunächst 24 h

bei Raumtemperatur gerührt, bevor erneut 30 mmol (3 mL) Essigsäureanhydrid sowie 5 mL Triethylamin hinzugegeben wurden. Nach weiteren 24 h rühren wurde das Produkt präzipitiert, indem 50 mL Diethylether und 50 mL Ethylazetat hinzugegeben wurden und die Mischung auf 4°C abgekühlt wurde. Das Produkt wurde durch Filtrieren isoliert und mit 5x 100 mL Diethylether trituriert, bevor es im Vakuum getrocknet wurde.

Das oxidierte mPEG-Aldehyd wurde mit Spermin verknüpft, indem 2 mM mPEG-Aldehyd mit einem 100-fachen molaren Überschuss an Spermin in Modifikationspuffer 2h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Überschüssiges Spermin wurde abgetrennt, indem der Ansatz 2 x 3 h gegen deionisiertes Wasser dialysiert wurde, wobei eine Dialysmembran mit einer Ausschlussgrenze von 1000 Da verwendet wurde. Das Produkt wurde schließlich lyophilisiert und zur Modifikation von RNA eingesetzt (6.5.6).

Modifikationspuffer: 50mM Na₂CO₃ pH 9,5; 100mM Natriumzitat; 50mM NaCNBH₃.

6.6.6 Biotin-Modifikation von Quercinsäure

Das Triterpen Quercinsäure wurde mit Biotin verknüpft, indem die Carboxylgruppe der Säure in einer EDC-medierten Reaktion mit der endständigen primären Aminogruppe eines Biotin-Derivats verknüpft wurde (Hermanson, 1996).

1 µg Quercinsäure wurde in einem Ansatzvolumen von 30 µL aufgenommen. Der Ansatz enthielt zusätzlich 100 mM MES pH 5, 33 mg/mL EDC sowie 16,7 mM Pentamin-Biotin (Pierce) und wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die modifizierte Säure wurde nicht gereinigt, sondern direkt für Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit lebenden Blutstrom-Trypanosomen verwendet (6.1.2.3), wobei bis zu 5 µL des Ansatzes eingesetzt wurden.

6.7 Quantitative Nachweissysteme

6.7.1 Analyse der Serumstabilität von RNA

Humanes Serum wurde gewonnen, indem humanes Vollblut nach Abschluss des Gerinnungsprozesses zentrifugiert wurde. Das flüssige Serum konnte so von festen Blutbestandteilen und Gerinnungsprodukten separiert werden und wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

Zur Analyse der Serumstabilität wurde 15 -33 fmol intern ³²P-markierte, gelgereinigte RNA eingesetzt und in einem Gesamtvolumen von 20 µL in mindestens 90 % (v/v) humanem Serum inkubiert. Die Inkubation wurde je nach verwendeter RNA-Präparation für bis zu 10 sec auf Eis oder bis zu 48 h bei 37°C durchgeführt, und es wurden im Verlauf der Inkubation Zeitproben genommen. Diese wurden mittels denaturierender 15 % (w/v) Polyacrylamidgelelektrophorese (6.2.2.2) und nachfolgender Autoradiographie (6.2.2.4) analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Software Image Gauge 4.23 (FujiFilm). Die Daten wurden angelehnt an eine exponentielle Abnahme ausgeglichen [$y = y_0 + A \exp (x-x_0/\tau)$].

6.7.2 Analyse der Bindeparameter von RNA-Aptameren

Zellbindungsexperimente wurden durchgeführt, indem $2 \cdot 10^7$ Blutstrom-Trypanosomen mit 1 – 10 fmol intern ^{32}P -markierten Aptamer-RNA in 100 μL Bindepuffer (5.4.2) inkubiert wurde. Die Inkubation fand in An- oder Abwesenheit von unmarkierten Aptamer-Präparationen statt. Die Trennung von gebundener und ungebundener RNA fand analog zu der in Homann *et al.* (2006) beschriebenen Methode statt: Nach 20 min wurde der Ansatz mit 100 μL Dibutylphthalat versetzt und 1 min bei 21000 g zentrifugiert. Dies führt zur Ausbildung einer wässrigen Phase, die aufgrund ihrer geringeren Dichte die organische Phase überschichtet. Lebende Trypanosomenzellen können aufgrund ihrer Dichteigenschaften im Verlauf der Zentrifugation die Dibutylphthalat-Schicht durchdringen und reichern sich zusammen mit zellgebundenen RNA-Molekülen als Pellet innerhalb der organischen Phase an. Ungebundene RNA-Moleküle verbleiben mit toten Zellen im wässrigen Überstand. Die Ansätze wurden im Anschluss an die Zentrifugation in flüssigem N_2 schockgefroren und die Pellet-enhaltene Spitze des Reaktionsgefäßes wurde abgetrennt. Auf diese Weise konnten das Zellpellet zusammen mit der zellgebundenen RNA getrennt von der ungebundenen RNA szintillatorisch vermessen werden (6.2.2.5). Dissoziationskonstanten (K_d) und Anzahl der Bindestellen (n) wurden anhand der Scatchard-Gleichung ermittelt ($r/[A] = n/K_d - r/K_d$)

6.7.3 Nachweis lebender Trypanosomenzellen

Lebende Trypanosomenzellen wurden mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Nachweissystems detektiert und quantifiziert. Hierfür wurde das farblose Molekül Calcein O,O'-diazetat tetrakis(azetoxymethyl) (Calcein-AM) eingesetzt. Das Zellmembranpermeable Calcein-AM wird von den endogenen Esterasen lebender Zellen hydrolysiert, woraufhin der Fluoreszenzfarbstoff Calcein freigesetzt wird. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional zur Anzahl lebender Zellen (Lichtenfels *et al.*, 1994).

Blutstrom-Trypanosomen wurden auf eine Zelldichte von 10^8 Zellen pro mL eingestellt und 10 – 100 μL der Zellsuspension wurden in Quantifizierungsexperimenten eingesetzt. Die Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten wahlweise in An- oder Abwesenheit von Substanzen inkubiert, die auf ihre Zytotoxizität untersucht werden sollten (siehe Abschnitt 6.1.2.5). Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit mindestens einem äquivalenten Volumen 5 μM Calcein-AM in PBSG versetzt, wobei das Gesamtvolumen des Ansatzes zwischen 70 μL und 200 μL liegen sollte. Die Ansätze wurden 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Detektion erfolgte mit dem Fluoro Image Analyzer FLA-5000 (FujiFilm) durch Anregung des Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 473 nm. Die Fluoreszenz wurde über einen monochromatischen Filter ($\lambda=510$ nm) mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die Visualisierung und Evaluation der Signale erfolgte unter Anwendung der Software Image Gauge 4.23 (FujiFilm).

6.7.4 Nachweis primärer Aminogruppen

Primäre Aminogruppen können mit Hilfe von Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) quantitativ nachgewiesen werden (Fields, 1972). Hierbei wird die farblose TNBS durch Reaktion mit primären Aminogruppen zu einem farbigen Derivat umgesetzt. Die Reaktion kann durch die Gelbfärbung der Lösung anhand der Absorption bei 335 nm verfolgt werden.

Die zu analysierende Probe wurde in 50 μL 100 mM NaHCO_3 , pH 8,5 aufgenommen und mit 25 μL 0,01 % (w/v) TNBS in 100 mM NaHCO_3 , pH 8,5 versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μL 10 % (w/v) SDS und 12,5 μL 1 M HCl gestoppt und die Absorption bei 335 nm gemessen.

6.7.5 Nachweis der Lyse von humanen Erythrozyten

Die Membranintegrität von humanen Erythrozyten kann anhand der Abgabe von Hämoglobin an das umgebende Medium analysiert werden, indem dessen Absorption bei 541 nm photometrisch bestimmt wird.

Humanes Erythrozytenkonzentrat mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^9$ Erythrozyten/mL wurde 3 x in je 2 mL 150 mM NaCl gewaschen und in dem ursprünglichen Volumen 150 mM NaCl aufgenommen. Die zu testende Komponente (PPAS, 6.6.2) wurde mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ in je 1 mL 100 mM $\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ mit unterschiedlichen pH Werten von pH 5 bis pH 7,5 vorgelegt. Die Lösung wurde mit 10 μL ($3 \cdot 10^7$ Zellen) der vorbereiteten Erythrozytensuspension versetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Intakte Zellen sowie Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (5 min, 5000 g) sedimentiert und die Absorption des Überstandes bei 541 nm gemessen.

7 Literatur

- Agranoff, D.; Stich, A.; Abel, P.; Krishna, S. (2005): Proteomic fingerprinting for the diagnosis of human African trypanosomiasis. In: Trends in parasitology, Jg. 21, H. 4, S. 154–157.
- Ahlquist, R. P. (1948): A study of the adrenotropic receptors. In: Am J Physiol, H. 153, S. 586–600.
- Aurup, H.; Tuschl, T.; Benseler, F.; Ludwig, J.; Eckstein, F. (1994): Oligonucleotide duplexes containing 2'-amino-2'-deoxycytidines: thermal stability and chemical reactivity. In: Nucleic acids research, Jg. 22, H. 1, S. 20–24.
- Bacchi, C. J.; Nathan, H. C.; Hutner, S. H.; McCann, P. P.; Sjoerdsma, A. (1980): Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. In: Science, Jg. 210, H. 4467, S. 332–334.
- Bacq ZM (1983) Chemical transmission of nerve impulses. In Parnham MJ, Bruinvels J (eds) Psycho- and Neuropharmacology. Discoveries in Pharmacology, Vol. 1. Elsevier, Amsterdam, pp 49-103
- Baines, I. C.; Colas, P. (2006): Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. In: Drug discovery today, Jg. 11, H. 7-8, S. 334–341.
- Balber, A. E. (1990): The pellicle and the membrane of the flagellum, flagellar adhesion zone, and flagellar pocket: functionally discrete surface domains of the bloodstream form of African trypanosomes. In: Critical reviews in immunology, Jg. 10, H. 3, S. 177–201.
- Balkenhohl, F.; Bussche-Hünnefeld C.; Lansky A.; Zechel C. (1996): Combinatorial Synthesis of Small Organic Molecules. In: Angew. Chem. Int. Ed., Jg. 35, H. 20, S. 2288–2337.
- Baral, T. N.; Magez, S.; Stijlemans, B.; Conrath, K.; Vanhollebeke, B.; Pays, E. et al. (2006): Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. In: Nature medicine, Jg. 12, H. 5, S. 580–584.
- Beavers, M. P.; Chen, X. (2002): Structure-based combinatorial library design: methodologies and applications. In: Journal of molecular graphics & modelling, Jg. 20, H. 6, S. 463–468.
- Bechinger, B.; Lohner, K. (2006): Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. In: Biochimica et biophysica acta, Jg. 1758, H. 9, S. 1529–1539.
- Beigelman, L.; McSwiggen, J. A.; Draper, K. G.; Gonzalez, C.; Jensen, K.; Karpeisky, A. M. et al. (1995): Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance. In: The Journal of biological chemistry, Jg. 270, H. 43, S. 25702–25708.
- Bello, J.; Bello, H. R.; Granados, E. (1982): Conformation and aggregation of melittin: dependence on pH and concentration. In: Biochemistry, Jg. 21, H. 3, S. 461–465.
- Berger, B. J.; Carter, N. S.; Fairlamb, A. H. (1995): Characterisation of pentamidine-resistant *Trypanosoma brucei* *brucei*. In: Molecular and biochemical parasitology, Jg. 69, H. 2, S. 289–298.
- Berriman, M.; Ghedin, E.; Hertz-Fowler, C.; Blandin, G.; Renauld, H.; Bartholomeu, D. C. et al. (2005): The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. In: Science, Jg. 309, H. 5733, S. 416–422.

- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic acids research*, Jg. 7, H. 6, S. 1513–1523.
- Bleicher, K. H.; Bohm, H. J.; Muller, K.; Alanine, A. I. (2003): Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. In: *Nature reviews*, Jg. 2, H. 5, S. 369–378.
- Bless, N. M.; Smith, D.; Charlton, J.; Czermak, B. J.; Schmal, H.; Friedl, H. P.; Ward, P. A. (1997): Protective effects of an aptamer inhibitor of neutrophil elastase in lung inflammatory injury. In: *Current biology*, Jg. 7, H. 11, S. 877–880.
- Blondelle, S. E.; Houghten, R. A. (1991): Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of melittin. In: *Biochemistry*, Jg. 30, H. 19, S. 4671–4678.
- Blondelle, S. E.; Houghten, R. A. (1991): Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of melittin. In: *Biochemistry*, Jg. 30, H. 19, S. 4671–4678.
- Bock, L. C.; Griffin, L. C.; Latham, J. A.; Vermaas, E. H.; Toole, J. J. (1992): Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. In: *Nature*, Jg. 355, H. 6360, S. 564–566.
- Bonner, G.; Patra, D.; Lafer, E. M. and Sousa, R. (1992) Mutations in T7 RNA polymerase that support the proposal for a common polymerase active site structure. *EMBO Journal* 11: 3767–3775.
- Boolell, M.; Allen, M. J.; Ballard, S. A.; Gepi-Attee, S.; Muirhead, G. J.; Naylor, A. M. et al. (1996): Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. In: *International journal of impotence research*, Jg. 8, H. 2, S. 47–52.
- Boomer, R. M.; Lewis, S. D.; Healy, J. M.; Kurz, M.; Wilson, C.; McCauley, T. G. (2005): Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues. In: *Oligonucleotides*, Jg. 15, H. 3, S. 183–195.
- Borst, P.; Fairlamb, A. H. (1998): Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. In: *Annual review of microbiology*, Jg. 52, S. 745–778.
- Brody, E. N.; Gold, L. (2000): Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. In: *Journal of biotechnology*, Jg. 74, H. 1, S. 5–13.
- Brody, E. N.; Gold, L. (2000): Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. In: *Journal of biotechnology*, Jg. 74, H. 1, S. 5–13.
- Bronner, U.; Brun, R.; Doua, F.; Ericsson, O.; Burri, C.; Keiser, J. et al. (1998): Discrepancy in plasma melarsoprol concentrations between HPLC and bioassay methods in patients with *T. gambiense* sleeping sickness indicates that melarsoprol is metabolized. In: *Tropical medicine & international health*, Jg. 3, H. 11, S. 913–917.
- Bunin B.; Ellman J. A. (1992): A general and expedient method for the solid-phase synthesis of 1,4-benzodiazepine derivatives. In: *J am chem soc*, H. 114, S. 10997–10998.
- Buske, C.; Feuring-Buske, M.; Unterhalt, M.; Hiddemann, W. (1999): New developments in therapy of non-Hodgkin lymphomas with monoclonal antibodies. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift*, Jg. 124, H. 27, S. 842–847.
- Butler, M. S. (2004): The role of natural product chemistry in drug discovery. In: *Journal of natural products*, Jg. 67, H. 12, S. 2141–2153.
- Carter, N. S.; Fairlamb, A. H. (1993): Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. In: *Nature*, Jg. 361, H. 6408, S. 173–176.

- Chamow, S. M.; Kogan, T. P.; Venuti, M.; Gadek, T.; Harris, R. J.; Peers, D. H. et al. (1994): Modification of CD4 immunoadhesin with monomethoxypoly(ethylene glycol) aldehyde via reductive alkylation. In: *Bioconjugate chemistry*, Jg. 5, H. 2, S. 133–140.
- Chang, C.; Ekins, S.; Bahadduri, P.; Swaan, P. W. (2006): Pharmacophore-based discovery of ligands for drug transporters. In: *Advanced drug delivery reviews*, Jg. 58, H. 12–13, S. 1431–1450.
- Chappuis, F.; Loutan, L.; Simarro, P.; Lejon, V.; Buscher, P. (2005): Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. In: *Clinical microbiology reviews*, Jg. 18, H. 1, S. 133–146.
- Choi, H. S.; Huh, J.; Jo, W. H. (2006): pH-induced helix-coil transition of amphipathic polypeptide and its association with the lipid bilayer: electrostatic energy calculation. In: *Biomacromolecules*, Jg. 7, H. 1, S. 403–406.
- Chu, B. C.; Wahl, G. M.; Orgel, L. E. (1983): Derivatization of unprotected polynucleotides. In: *Nucleic acids research*, Jg. 11, H. 18, S. 6513–6529.
- Clark, D. E.; Willett, P.; Kenny, P. W. (1993): Pharmacophoric pattern matching in files of three-dimensional chemical structures: implementation of flexible searching. In: *Journal of molecular graphics*, Jg. 11, H. 3, S. 146–156.
- Colotto, A.; Kharakoz, D. P.; Lohner, K.; Laggner, P. (1993): Ultrasonic study of melittin effects on phospholipid model membranes. In: *Biophysical journal*, Jg. 65, H. 6, S. 2360–2367.
- Cross, G. A. (1975): Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. In: *Parasitology*, Jg. 71, H. 3, S. 393–417.
- Cross, G. A.; Manning, J. C. (1973): Cultivation of *Trypanosoma brucei* sspp. in semi-defined and defined media. In: *Parasitology*, Jg. 67, H. 3, S. 315–331.
- Czworkowski, J.; Odom, O. W.; Hardesty, B. (1991): Fluorescence study of the topology of messenger RNA bound to the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. In: *Biochemistry*, Jg. 30, H. 19, S. 4821–4830.
- Damper, D.; Patton, C. L. (1976a): Pentamidine transport and sensitivity in brucei-group trypanosomes. In: *The Journal of protozoology*, Jg. 23, H. 2, S. 349–356.
- Damper, D.; Patton, C. L. (1976b): Pentamidine transport in *Trypanosoma brucei*-kinetics and specificity. In: *Biochemical pharmacology*, Jg. 25, H. 3, S. 271–276.
- Dathe, M.; Wieprecht, T. (1999): Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1462, H. 1–2, S. 71–87.
- de Smidt P. C.; Le Doan, T.; Falco, S. de; van, BerkelT J. (1991): Association of antisense oligonucleotides with lipoproteins prolongs the plasma half-life and modifies the tissue distribution. In: *Nucleic acids research*, Jg. 19, H. 17, S. 4695–4700.
- DeGrado, W. F.; Musso, G. F.; Lieber, M.; Kaiser, E. T.; Kezdy, F. J. (1982): Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue. In: *Biophysical journal*, Jg. 37, H. 1, S. 329–338.
- Delespaulx, V.; de, KoningH P. (2007): Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. In: *Drug resistance updates*, Jg. 10, H. 1–2, S. 30–50.
- Dempsey, C. E. (1990): The actions of melittin on membranes. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1031, H. 2, S. 143–161.

- Doggrell, S. A. (2005): Pegaptanib: the first antiangiogenic agent approved for neovascular macular degeneration. In: Expert opinion on pharmacotherapy, Jg. 6, H. 8, S. 1421–1423.
- Doua, F.; Boa, F. Y.; Schechter, P. J.; Miezian, T. W.; Diai, D.; Sanon, S. R. et al. (1987): Treatment of human late stage gambiense trypanosomiasis with alpha-difluoromethylornithine (eflornithine): efficacy and tolerance in 14 cases in Cote d'Ivoire. In: The American journal of tropical medicine and hygiene, Jg. 37, H. 3, S. 525–533.
- Dougan, H.; Lyster, D. M.; Vo, C. V.; Stafford, A.; Weitz, J. I.; Hobbs, J. B. (2000): Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. In: Nuclear medicine and biology, Jg. 27, H. 3, S. 289–297.
- Drews, J. (2000): Drug discovery: a historical perspective. In: Science, Jg. 287, H. 5460, S. 1960–1964.
- Dumas M, Bouteille B. Buguet A. (Hg.) (1999): Progress in Human African Trypanosomiasis. 1st edn.: Springer-Verlag.
- Dumas M, Bisser S. (1999): Clinical aspects of human African trypanosomiasis. In: Dumas M, Bouteille B. Buguet A. (Hg.): Progress in Human African Trypanosomiasis. 1st edn.: Springer-Verlag, S. 344.
- Eaton, B. E.; Pieken, W. A. (1995): Ribonucleosides and RNA. In: Annual review of biochemistry, Jg. 64, S. 837–863.
- Eccleston, M. E.; Kuiper, M.; Gilchrist, F. M.; Slater, N. K. (2000): pH-responsive pseudo-peptides for cell membrane disruption. In: Journal of controlled release, Jg. 69, H. 2, S. 297–307.
- Eccleston M.E., Slater N.K.H. Tighe B.J. (1999): Synthetic routes to responsive polymers; Co-polycondensation of tri-functional amino acids with diacylchlorides. In: Reactive and Functional Polymers, Jg. 42, H. 2, S. 147–161.
- Eddershaw, P. J.; Beresford, A. P.; Bayliss, M. K. (2000): ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. In: Drug discovery today, Jg. 5, H. 9, S. 409–414.
- Egli M., Sarkhel S. Minasov G. Rich A. (2003): Structure and Function of the Ribosomal Frameshifting Pseudoknot RNA from Beet Western Yellow Virus. In: Helvetica Chimica Acta, Jg. 86, H. 5, S. 1522–2675.
- Ehrlich, P. (1897): Zur Kenntnis der Antitoxinwirkung. In: Fortschr. d. Med., Jg. 15, H. 2, S. 41–43.
- Ehrlich, P. (1909): Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. In: Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, H. 42, S. 17–47.
- Ellington, A. D.; Szostak, J. W. (1990): In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. In: Nature, Jg. 346, H. 6287, S. 818–822.
- El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Blandin, G.; Berriman, M.; Crabtree, J.; Aggarwal, G. et al. (2005a): Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. In: Science, Jg. 309, H. 5733, S. 404–409.
- El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A. N. et al. (2005b): The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. In: Science, Jg. 309, H. 5733, S. 409–415.
- England, T. E.; Bruce, A. G.; Uhlenbeck, O. C. (1980): Specific labeling of 3' termini of RNA with T4 RNA ligase. In: Methods Enzymol., H. 65, S. 65–74.
- Engstler, M.; Thilo, L.; Weise, F.; Grunfelder, C. G.; Schwarz, H.; Boshart, M.; Overath, P. (2004): Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface

- glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. In: *Journal of cell science*, Jg. 117, H. Pt 7, S. 1105–1115.
- Eulberg, D.; Klussmann, S. (2003): Spiegelmers: biostable aptamers. In: *Chembiochem*, Jg. 4, H. 10, S. 979–983. Online verfügbar unter doi:10.1002/cbic.200300663.
- Ferrito, M.; Tirrell D. A. (1992): Poly(2-ethacrylic acid). In: *Macromol. Synth.*, H. 11, S. 59–62.
- Fields, R. (1972): The rapid determination of amino groups with TNBS. In: Hiss, H. W. & Timasheff S. N. (Hg.): *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press (25), S. 464–468.
- Fleming, A. (1929): Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. In: *British Journal of Experimental Pathology*, H. 10, S. 226–236.
- Floege, J.; Ostendorf, T.; Janssen, U.; Burg, M.; Radeke, H. H.; Vargeese, C. et al. (1999): Novel approach to specific growth factor inhibition in vivo: antagonism of platelet-derived growth factor in glomerulonephritis by aptamers. In: *The American journal of pathology*, Jg. 154, H. 1, S. 169–179.
- Foloppe, N.; MacKerell, A. rD.J. (1999): Intrinsic conformational properties of deoxyribonucleosides: implicated role for cytosine in the equilibrium among the A, B, and Z forms of DNA. In: *Biophysical journal*, Jg. 76, H. 6, S. 3206–3218.
- Gordon, E. M.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P.; Gallop, M. A. (1994): Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions. In: *Journal of medicinal chemistry*, Jg. 37, H. 10, S. 1385–1401.
- Göringer, H. U.; Homann, M.; Lörger, M. (2003): In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules. In: *International journal for parasitology*, Jg. 33, H. 12, S. 1309–1317.
- Green, L. S.; Bell, C.; Janjic, N. (2001): Aptamers as reagents for high-throughput screening. In: *BioTechniques*, Jg. 30, H. 5, S. 1094–6, 1098, 1100 passim.
- Güner, O. F. (Hg.) (2000): *Pharmacophore Perception, Development and Use in Drug Design*. International University Line, La Jolla, CA.
- Guschlbauer, W.; Blandin, M.; Drocourt, J. L.; Thang, M. N. (1977): Poly-2'-deoxy-2'-fluoro-cytidylic acid: enzymatic synthesis, spectroscopic characterization and interaction with poly-inosinic acid. In: *Nucleic acids research*, Jg. 4, H. 6, S. 1933–1943.
- Guschlbauer, W.; Jankowski, K. (1980): Nucleoside conformation is determined by the electronegativity of the sugar substituent. In: *Nucleic acids research*, Jg. 8, H. 6, S. 1421–1433.
- Habermann, E. (1972): Bee and wasp venoms. In: *Science*, Jg. 177, H. 46, S. 314–322.
- Hager, K. M.; Pierce, M. A.; Moore, D. R.; Tytler, E. M.; Esko, J. D.; Hajduk, S. L. (1994): Endocytosis of a cytotoxic human high density lipoprotein results in disruption of acidic intracellular vesicles and subsequent killing of African trypanosomes. In: *The Journal of cell biology*, Jg. 126, H. 1, S. 155–167.
- Hanahan, D.; Meselson, M. (1983): Plasmid screening at high colony density. In: *Methods in enzymology*, Jg. 100, S. 333–342.
- Hann, M. M.; Leach, A. R.; Harper, G. (2001): Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. In: *Journal of chemical information and computer sciences*, Jg. 41, H. 3, S. 856–864.

- Healy, J. M.; Lewis, S. D.; Kurz, M.; Boomer, R. M.; Thompson, K. M.; Wilson, C.; McCauley, T. G. (2004): Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. In: *Pharmaceutical research*, Jg. 21, H. 12, S. 2234–2246.
- Hermann, T.; Patel, D. J. (2000): Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. In: *Science*, Jg. 287, H. 5454, S. 820–825.
- Hider, R. C.; Khader, F.; Tatham, A. S. (1983): Lytic activity of monomeric and oligomeric melittin. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 728, H. 2, S. 206–214.
- Hilbers, C. W.; Michiels, P. J.; Heus, H. A. (1998): New developments in structure determination of pseudoknots. In: *Biopolymers*, Jg. 48, H. 2-3, S. 137–153.
- Hirschmann, R. (1991): Medicinal Chemistry in the Golden Age of Biology: Lessons from Steroid and Peptide Research. In: *Angew. Chem. Int. Ed.*, H. 30, S. 1278–1301.
- Hirumi, H.; Hirumi, K. (1994): Axenic culture of African trypanosome bloodstream forms. In: *Parasitology today*, Jg. 10, H. 2, S. 80–84.
- Hiss, H. W. & Timasheff S. N. (Hg.) (1972): *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press (25).
- Ho, C. M.; Marshall, G. R. (1993): FOUNDATION: a program to retrieve all possible structures containing a user-defined minimum number of matching query elements from three-dimensional databases. In: *Journal of computer-aided molecular design*, Jg. 7, H. 1, S. 3–22.
- Hoffmann, Felix (1900): Acetyl Salicylic Acid. United States Patent No. 644077
- Homann, M.; Göringer, H. U. (1999): Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. In: *Nucleic acids research*, Jg. 27, H. 9, S. 2006–2014.
- Homann, M.; Göringer, H. U. (2001): Uptake and intracellular transport of RNA aptamers in African trypanosomes suggest therapeutic "piggy-back" approach. In: *Bioorganic & medicinal chemistry*, Jg. 9, H. 10, S. 2571–2580.
- Homann, M.; Lörger, M.; Engstler, M.; Zacharias, M.; Göringer, H. U. (2006): Serum-stable RNA aptamers to an invariant surface domain of live African trypanosomes. In: *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, Jg. 9, H. 7, S. 491–499.
- Hung, S. H.; Yu, Q.; Gray, D. M.; Ratliff, R. L. (1994): Evidence from CD spectra that d(purine).r(pyrimidine) and r(purine).d(pyrimidine) hybrids are in different structural classes. In: *Nucleic acids research*, Jg. 22, H. 20, S. 4326–4334.
- Ivens, A. C.; Peacock, C. S.; Worthey, E. A.; Murphy, L.; Aggarwal, G.; Berriman, M. et al. (2005): The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. In: *Science*, Jg. 309, H. 5733, S. 436–442.
- Jellinek, D.; Green, L. S.; Bell, C.; Lynott, C. K.; Gill, N.; Vargeese, C. et al. (1995): Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. In: *Biochemistry*, Jg. 34, H. 36, S. 11363–11372.
- Johnson, J. G.; Cross, G. A. (1979): Selective cleavage of variant surface glycoproteins from *Trypanosoma brucei*. In: *The Biochemical journal*, Jg. 178, H. 3, S. 689–697.
- Jorgensen, W. L. (2004): The many roles of computation in drug discovery. In: *Science*, Jg. 303, H. 5665, S. 1813–1818.
- Karipides, Anastas; Miller, Connie (1984): Crystal structure of calcium 2-fluorobenzoate dihydrate: indirect calcium...fluorine binding through a water-bridged outer-sphere intermolecular hydrogen bond. In: *Journal of the American Chemical Society*, Jg. 106, H. 5, S. 1494–1495.
- Kauffman, S.; Ellington, A. D. (1999): Thinking combinatorially. In: *Current opinion in chemical biology*, Jg. 3, H. 3, S. 256–259.

- Kawasaki, A. M.; Casper, M. D.; Freier, S. M.; Lesnik, E. A.; Zounes, M. C.; Cummins, L. L. et al. (1993): Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. In: *Journal of medicinal chemistry*, Jg. 36, H. 7, S. 831–841.
- Keiser, J.; Ericsson, O.; Burri, C. (2000): Investigations of the metabolites of the trypanocidal drug melarsoprol. In: *Clinical pharmacology and therapeutics*, Jg. 67, H. 5, S. 478–488. O
- Kennedy, T. (1997): Managing the drug discovery/development interface. In: *Drug disc tod*, Jg. 2, H. 10, S. 436–444.
- Kennedy, P. G. (2006): Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis. In: *International journal for parasitology*, Jg. 36, H. 5, S. 505–512.
- Khati, M.; Schuman, M.; Ibrahim, J.; Sattentau, Q.; Gordon, S.; James, W. (2003): Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2'-F-RNA aptamers. In: *Journal of virology*, Jg. 77, H. 23, S. 12692–12698.
- Klussmann, S.; Nolte, A.; Bald, R.; Erdmann, V. A.; Furste, J. P. (1996): Mirror-image RNA that binds D-adenosine. In: *Nature biotechnology*, Jg. 14, H. 9, S. 1112–1115.
- Kourlas, H.; Schiller, D. S. (2006): Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: a review. In: *Clinical therapeutics*, Jg. 28, H. 1, S. 36–44.
- Kubinyi, H. (2004): In Search for New Leads. In: *Industrial Pharmacy*, S. 7–10.
- Kuntz, I. D. (1992): Structure-based strategies for drug design and discovery. In: *Science*, Jg. 257, H. 5073, S. 1078–1082.
- Lackey, C. A.; Murthy, N.; Press, O. W.; Tirrell, D. A.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. (1999): Hemolytic activity of pH-responsive polymer-streptavidin bioconjugates. In: *Bioconjugate chemistry*, Jg. 10, H. 3, S. 401–405.
- Landfear, S. M.; Ignatushchenko, M. (2001): The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. In: *Molecular and biochemical parasitology*, Jg. 115, H. 1, S. 1–17.
- Langley, J. N. (1905): On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. In: *The Journal of physiology*, Jg. 33, H. 4-5, S. 374–413.
- Layzer, J. M.; McCaffrey, A. P.; Tanner, A. K.; Huang, Z.; Kay, M. A.; Sullenger, B. A. (2004): In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. In: *RNA*, Jg. 10, H. 5, S. 766–771.
- Lee, S. W.; Sullenger, B. A. (1996): Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that selectively blocks autoantibody binding to insulin receptors on human lymphocytes. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 184, H. 2, S. 315–324.
- Lee, S. W.; Sullenger, B. A. (1997): Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies. In: *Nature biotechnology*, Jg. 15, H. 1, S. 41–45.
- Legros, D.; Ollivier, G.; Gastellu-Etchegorry, M.; Paquet, C.; Burri, C.; Jannin, J.; Buscher, P. (2002): Treatment of human African trypanosomiasis--present situation and needs for research and development. In: *The Lancet infectious diseases*, Jg. 2, H. 7, S. 437–440.
- Lei, Q. P.; Lamb, D. H.; Heller, R. K.; Shannon, A. G.; Ryall, R.; Cash, P. (2002): Kinetic studies on the rate of hydrolysis of N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimide in

- aqueous solutions using mass spectrometry and capillary electrophoresis. In: Analytical biochemistry, Jg. 310, H. 1, S. 122–124.
- Lesnik, E. A.; Guinasso, C. J.; Kawasaki, A. M.; Sasmor, H.; Zounes, M.; Cummins, L. L. et al. (1993): Oligodeoxynucleotides containing 2'-O-modified adenosine: synthesis and effects on stability of DNA:RNA duplexes. In: Biochemistry, Jg. 32, H. 30, S. 7832–7838.
- Li, A. P. (2001): Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. In: Drug disc tod, Jg. 6, H. 7, S. 357–366.
- Li, F.; Hua, S. B.; Wang, C. C.; Gottesdiener, K. M. (1998): Trypanosoma brucei brucei: characterization of an ODC null bloodstream form mutant and the action of alpha-difluoromethylornithine. In: Experimental parasitology, Jg. 88, H. 3, S. 255–257.
- Li, W.; Nicol, F.; Szoka, F. rC.J. (2004): GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. In: Advanced drug delivery reviews, Jg. 56, H. 7, S. 967–985.
- Lichtenfels, R.; Biddison, W. E.; Schulz, H.; Vogt, A. B.; Martin, R. (1994): CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte activity. In: Journal of immunological methods, Jg. 172, H. 2, S. 227–239.
- Lin, J.; Sahakian, D. C.; de, MoraisS M.; Xu, J. J.; Polzer, R. J.; Winter, S. M. (2003): The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. In: Current topics in medicinal chemistry, Jg. 3, H. 10, S. 1125–1154.
- Lipinski, C.; Hopkins, A. (2004): Navigating chemical space for biology and medicine. In: Nature, Jg. 432, H. 7019, S. 855–861.
- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. (1997): Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. In: Advanced drug delivery reviews, Jg. 46, H. 1-3, S. 3–25.
- Loew, G. H.; Villar, H. O.; Alkorta, I. (1993): Strategies for indirect computer-aided drug design. In: Pharmaceutical research, Jg. 10, H. 4, S. 475–486.
- Lorger, M.; Engstler, M.; Homann, M.; Göringer, H. U. (2003): Targeting the variable surface of African trypanosomes with variant surface glycoprotein-specific, serum-stable RNA aptamers. In: Eukaryotic cell, Jg. 2, H. 1, S. 84–94.
- McCann, P. P.; Bacchi, C. J.; Clarkson, A. rB.J.; Seed, J. R.; Nathan, H. C.; Amole, B. O. et al. (1981): Further studies on difluoromethylornithine in African trypanosomes. In: Medical biology, Jg. 59, H. 5-6, S. 434–440.
- Micklefield, J. (2001): Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications. In: Current medicinal chemistry, Jg. 8, H. 10, S. 1157–1179.
- Milligan, J. F.; Groebe, D. R.; Witherell, G. W.; Uhlenbeck, O. C. (1987): Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. In: Nucleic acids research, Jg. 15, H. 21, S. 8783–8798.
- Murray-Rust, Peter; Stallings, William C.; Monti, Claire T.; Preston, Robert K.; Glusker, Jenny P. (1983): Intermolecular interactions of the carbon-fluorine bond: the crystallographic environment of fluorinated carboxylic acids and related structures. In: Journal of the American Chemical Society, Jg. 105, H. 10, S. 3206–3214.
- Murthy, N.; Robichaud, J. R.; Tirrell, D. A.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S. (1999): The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption. In: Journal of controlled release, Jg. 61, H. 1-2, S. 137–143.

- Nicol, F.; Nir, S.; Szoka, F. rC.J. (1999): Orientation of the pore-forming peptide GALA in POPC vesicles determined by a BODIPY-avidin/biotin binding assay. In: *Biophysical journal*, Jg. 76, H. 4, S. 2121–2141.
- Nightingale, S. L. (1991): From the Food and Drug Administration. In: *JAMA*, Jg. 265, H. 10, S. 1229.
- Nimjee, S. M.; Rusconi, C. P.; Sullenger, B. A. (2005): Aptamers: an emerging class of therapeutics. In: *Annual review of medicine*, Jg. 56, S. 555–583.
- Nolte, A.; Klusmann, S.; Bald, R.; Erdmann, V. A.; Furste, J. P. (1996): Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. In: *Nature biotechnology*, Jg. 14, H. 9, S. 1116–1119. Online verfügbar unter doi:10.1038/nbt0996-1116.
- Odom, O. rW.J.; Robbins, D. J.; Lynch, J.; Dottavio-Martin, D.; Kramer, G.; Hardesty, B. (1980): Distances between 3' ends of ribosomal ribonucleic acids reassembled into *Escherichia coli* ribosomes. In: *Biochemistry*, Jg. 19, H. 26, S. 5947–5954.
- Oli, M. W.; Cotlin, L. F.; Shiflett, A. M.; Hajduk, S. L. (2006): Serum resistance-associated protein blocks lysosomal targeting of trypanosome lytic factor in *Trypanosoma brucei*. In: *Eukaryotic cell*, Jg. 5, H. 1, S. 132–139.
- Osborne, S. E.; Ellington, A. D. (1997): Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry. In: *Chemical reviews*, Jg. 97, H. 2, S. 349–370.
- Overath, P.; Engstler, M. (2004): Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. In: *Molecular microbiology*, Jg. 53, H. 3, S. 735–744.
- Padilla, R.; Sousa, R. (1999): Efficient synthesis of nucleic acids heavily modified with non-canonical ribose 2'-groups using a mutant T7 RNA polymerase (RNAP). In: *Nucleic acids research*, Jg. 27, H. 6, S. 1561–1563.
- Pan, W.; Craven, R. C.; Qiu, Q.; Wilson, C. B.; Wills, J. W.; Golovine, S.; Wang, J. F. (1995): Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 92, H. 25, S. 11509–11513.
- Pan, Y.; MacKerell, A. rD.J. (2003): Altered structural fluctuations in duplex RNA versus DNA: a conformational switch involving base pair opening. In: *Nucleic acids research*, Jg. 31, H. 24, S. 7131–7140.
- Papadopoulos, M. C.; Abel, P. M.; Agranoff, D.; Stich, A.; Tarelli, E.; Bell, B. A. et al. (2004): A novel and accurate diagnostic test for human African trypanosomiasis. In: *Lancet*, Jg. 363, H. 9418, S. 1358–1363.
- Parente, R. A.; Nadasdi, L.; Subbarao, N. K.; Szoka, F. rC.J. (1990): Association of a pH-sensitive peptide with membrane vesicles: role of amino acid sequence. In: *Biochemistry*, Jg. 29, H. 37, S. 8713–8719.
- Parente, R. A.; Nir, S.; Szoka, F. rC.J. (1988): pH-dependent fusion of phosphatidylcholine small vesicles. Induction by a synthetic amphipathic peptide. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 263, H. 10, S. 4724–4730.
- Parnham MJ, Bruinvels J. (Hg.): *Psycho- and Neuropharmacology. Discoveries in Pharmacology*: Elsevier (Vol. 1).
- Parnham MJ, Bruinvels J. (Hg.): *Psycho- and Neuropharmacology. Discoveries in Pharmacology*: Elsevier (Vol. 1).
- Pays, E.; Nolan, D. P. (1998): Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. In: *Molecular and biochemical parasitology*, Jg. 91, H. 1, S. 3–36.

- Pays, E.; Vanhamme, L.; Perez-Morga, D. (2004): Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. In: *Current opinion in microbiology*, Jg. 7, H. 4, S. 369–374.
- Pays, E.; Vanhollebeke, B.; Vanhamme, L.; Paturiaux-Hanocq, F.; Nolan, D. P.; Perez-Morga, D. (2006): The trypanolytic factor of human serum. In: *Nature reviews*, Jg. 4, H. 6, S. 477–486.
- Pepin, J.; Milord, F. (1994): The treatment of human African trypanosomiasis. In: *Advances in parasitology*, Jg. 33, S. 1–47.
- Pepin, J.; Milord, F.; Guern, C.; Schechter, P. J. (1987): Difluoromethylornithine for arseno-resistant *Trypanosoma brucei* gambiense sleeping sickness. In: *Lancet*, Jg. 2, H. 8573, S. 1431–1433.
- Perez-Morga, D.; Vanhollebeke, B.; Paturiaux-Hanocq, F.; Nolan, D. P.; Lins, L.; Homble, F. et al. (2005): Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. In: *Science*, Jg. 309, H. 5733, S. 469–472.
- Pestourie, C.; Tavitian, B.; Duconge, F. (2005): Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. In: *Biochimie*, Jg. 87, H. 9-10, S. 921–930.
- Pleij, C. W.; Rietveld, K.; Bosch, L. (1985): A new principle of RNA folding based on pseudoknotting. In: *Nucleic acids research*, Jg. 13, H. 5, S. 1717–1731.
- Prentis, R. A.; Lis, Y.; Walker, S. R. (1988): Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). In: *British journal of clinical pharmacology*, Jg. 25, H. 3, S. 387–396.
- Pringle, J. R. (1975): Methods for avoiding proteolytic artefacts in studies of enzymes and other proteins from yeasts. In: *Methods in cell biology*, Jg. 12, S. 149–184.
- Puglisi, J. D.; Wyatt, J. R.; Tinoco, I. rJ (1990): Conformation of an RNA pseudoknot. In: *Journal of molecular biology*, Jg. 214, H. 2, S. 437–453.
- Quang, D. N.; Arakawa, Y.; Hashimoto, T.; Asakawa, Y. (2005): Lanostane triterpenoids from the inedible mushroom *Fomitopsis spraguei*. In: *Phytochemistry*, Jg. 66, H. 14, S. 1656–1661.
- Davies, G. I. C. a. D. R. (Hg.) (1971): *Procedures in nucleic acid research*. New York: Harper and Row.
- Raghuraman, H.; Chattopadhyay, A. (2006): Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. In: *Bioscience reports*.
- Reusser, P. (2000): Antiviral therapy: current options and challenges. In: *Schweizerische medizinische Wochenschrift*, Jg. 130, H. 4, S. 101–112.
- Reyderman, L.; Stavchansky, S. (1998): Pharmacokinetics and biodistribution of a nucleotide-based thrombin inhibitor in rats. In: *Pharmaceutical research*, Jg. 15, H. 6, S. 904–910.
- Richardson, C. C. (1971): Polynucleotide kinase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. In: Davies, G. I. C. a. D. R. (Hg.): *Procedures in nucleic acid research*. New York: Harper and Row.
- Rietveld, K.; van Poelgeest, R.; Pleij, C. W.; Van, BoomJ H.; Bosch, L. (1982): The tRNA-like structure at the 3' terminus of turnip yellow mosaic virus RNA. Differences and similarities with canonical tRNA. In: *Nucleic acids research*, Jg. 10, H. 6, S. 1929–1946.
- Rifkin, M. R. (1978): Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: high density lipoprotein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 75, H. 7, S. 3450–3454.

- Rosecke, J.; Konig, W. A. (2000): Constituents of the fungi *Daedalea quercina* and *Daedaleopsis confragosa* var. *tricolor*. In: *Phytochemistry*, Jg. 54, H. 8, S. 757–762.
- Rozema, D. B.; Ekena, K.; Lewis, D. L.; Loomis, A. G.; Wolff, J. A. (2003): Endosomolysis by masking of a membrane-active agent (EMMA) for cytoplasmic release of macromolecules. In: *Bioconjugate chemistry*, Jg. 14, H. 1, S. 51–57.
- Ruckman, J.; Green, L. S.; Beeson, J.; Waugh, S.; Gillette, W. L.; Henninger, D. D. et al. (1998): 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 273, H. 32, S. 20556–20567.
- Rusconi, C. P.; Scardino, E.; Layzer, J.; Pitoc, G. A.; Ortel, T. L.; Monroe, D.; Sullenger, B. A. (2002): RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. In: *Nature*, Jg. 419, H. 6902, S. 90–94.
- Rusconi, C. P.; Yeh, A.; Lyerly, H. K.; Lawson, J. H.; Sullenger, B. A. (2000): Blocking the initiation of coagulation by RNA aptamers to factor VIIa. In: *Thrombosis and haemostasis*, Jg. 84, H. 5, S. 841–848.
- Saberwal, G.; Nagaraj, R. (1994): Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1197, H. 2, S. 109–131.
- Scatchard G. (1949): The attractions of proteins for small molecules and ions. In: *Ann. NY Acad. Sci.*, H. 51, S. 660–672.
- Shiflett, A. M.; Faulkner, S. D.; Cotlin, L. F.; Widener, J.; Stephens, N.; Hajduk, S. L. (2007): African trypanosomes: intracellular trafficking of host defense molecules. In: *The Journal of eukaryotic microbiology*, Jg. 54, H. 1, S. 18–21.
- Shoji, A.; Kuwahara, M.; Ozaki, H.; Sawai, H. (2007): Modified DNA aptamer that binds the (R)-isomer of a thalidomide derivative with high enantioselectivity. In: *Journal of the American Chemical Society*, Jg. 129, H. 5, S. 1456–1464.
- Sitaram, N.; Nagaraj, R. (1999): Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1462, H. 1–2, S. 29–54.
- Soeiro, M. N.; De, Souza E. M.; Stephens, C. E.; Boykin, D. W. (2005): Aromatic diamidines as antiparasitic agents. In: *Expert opinion on investigational drugs*, Jg. 14, H. 8, S. 957–972.
- Soukup, G. A.; Breaker, R. R. (1999): Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA. In: *RNA*, Jg. 5, H. 10, S. 1308–1325.
- Stahmann MA, Huebner CF Link KP. (1941): Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. V. Identification and synthesis of the hemorrhagic agent. In: *J Biol Chem*, H. 138, S. 513–527.
- Stahura, F. L.; Bajorath, J. (2004): Virtual screening methods that complement HTS. In: *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, Jg. 7, H. 4, S. 259–269.
- Sternberg, J. M. (1998): Immunobiology of African trypanosomiasis. In: *Chemical immunology*, Jg. 70, S. 186–199.
- Stijlemans, B.; Conrath, K.; Cortez-Retamozo, V.; van Xong, H.; Wyns, L.; Senter, P. et al. (2004): Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 279, H. 2, S. 1256–1261.

- Subbalakshmi, C.; Nagaraj, R.; Sitaram, N. (1999): Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. In: *FEBS letters*, Jg. 448, H. 1, S. 62–66.
- Subbarao, N. K.; Fielding, C. J.; Hamilton, R. L.; Szoka, F. rC.J. (1988): Lecithin:cholesterol acyltransferase activation by synthetic amphipathic peptides. In: *Proteins*, Jg. 3, H. 3, S. 187–198.
- Subbarao, N. K.; Parente, R. A.; Szoka, F. rC.J.; Nadasdi, L.; Pongracz, K. (1987): pH-dependent bilayer destabilization by an amphipathic peptide. In: *Biochemistry*, Jg. 26, H. 11, S. 2964–2972.
- Suck, D.; Saenger, W.; Main, P.; Germain, G.; Declercq, J. P. (1974): X-ray structure of 3',5'-diacetyl-2'-deoxy-2'-fluorouridine: a pyrimidine nucleoside in the syn conformation. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 361, H. 3, S. 257–265.
- Terwilliger, T. C.; Eisenberg, D. (1982a): The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 257, H. 11, S. 6010–6015.
- Terwilliger, T. C.; Eisenberg, D. (1982b): The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 257, H. 11, S. 6016–6022.
- Thompson, T. N. (2000): Early ADME in support of drug discovery: the role of metabolic stability studies. In: *Current drug metabolism*, Jg. 1, H. 3, S. 215–241.
- Thompson, T. N. (2000): Early ADME in support of drug discovery: the role of metabolic stability studies. In: *Current drug metabolism*, Jg. 1, H. 3, S. 215–241.
- Tonge, S. R.; Tighe, B. J. (2001): Responsive hydrophobically associating polymers: a review of structure and properties. In: *Advanced drug delivery reviews*, Jg. 53, H. 1, S. 109–122.
- Tosteson, M. T.; Holmes, S. J.; Razin, M.; Tosteson, D. C. (1985): Melittin lysis of red cells. In: *The Journal of membrane biology*, Jg. 87, H. 1, S. 35–44.
- Tosteson, M. T.; Tosteson, D. C. (1981): The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers. In: *Biophysical journal*, Jg. 36, H. 1, S. 109–116.
- Truc, P.; Lejon, V.; Magnus, E.; Jamonneau, V.; Nangouma, A.; Verloo, D. et al. (2002): Evaluation of the micro-CATT, CATT/Trypanosoma brucei gambiense, and LATEX/T b gambiense methods for serodiagnosis and surveillance of human African trypanosomiasis in West and Central Africa. In: *Bulletin of the World Health Organization*, Jg. 80, H. 11, S. 882–886.
- Tucker, C. E.; Chen, L. S.; Judkins, M. B.; Farmer, J. A.; Gill, S. C.; Drolet, D. W. (1999): Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. In: *Journal of chromatography*, Jg. 732, H. 1, S. 203–212.
- Tuerk, C.; Gold, L. (1990): Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. In: *Science*, Jg. 249, H. 4968, S. 505–510.
- Tuerk, C.; MacDougall, S.; Gold, L. (1992): RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 89, H. 15, S. 6988–6992.
- Uchida, Egami (1971): *The Enzymes*, Vol. IV, pp. 205-250. 3. Aufl.: P.D. Boyer editor, Academic Press.
- Ulrich, H. (2005): DNA and RNA aptamers as modulators of protein function. In: *Medicinal chemistry*, Jg. 1, H. 2, S. 199–208.

- van Drie, J. H.; Weininger, D.; Martin, Y. C. (1989): ALADDIN: an integrated tool for computer-assisted molecular design and pharmacophore recognition from geometric, steric, and substructure searching of three-dimensional molecular structures. In: *Journal of computer-aided molecular design*, Jg. 3, H. 3, S. 225–251.
- van Nieuwenhove, S. Declercq J.: Nifurtimox therapy in late-stage arsenical refractory gambiense sleeping sickness, S. 264.
- van Nieuwenhove, S. (1992): Advances in sleeping sickness therapy. In: *Annales de la Societe belge de medecine tropicale*, Jg. 72 Suppl 1, S. 39–51.
- van Nieuwenhove, S.; Schechter, P. J.; Declercq, J.; Bone, G.; Burke, J.; Sjoerdsma, A. (1985): Treatment of gambiense sleeping sickness in the Sudan with oral DFMO (DL- α -difluoromethylornithine), an inhibitor of ornithine decarboxylase; first field trial. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Jg. 79, H. 5, S. 692–698.
- Vanhamme, L.; Paturiaux-Hanocq, F.; Poelvoorde, P.; Nolan, D. P.; Lins, L.; van Den, Abbeele J. et al. (2003): Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. In: *Nature*, Jg. 422, H. 6927, S. 83–87.
- Vieth, M.; Siegel, M. G.; Higgs, R. E.; Watson, I. A.; Robertson, D. H.; Savin, K. A. et al. (2004): Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. In: *Journal of medicinal chemistry*, Jg. 47, H. 1, S. 224–232.
- Walters, W. P.; Ajay; Murcko, M. A. (1999): Recognizing molecules with drug-like properties. In: *Current opinion in chemical biology*, Jg. 3, H. 4, S. 384–387.
- Wang, C. C. (1995): Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. In: *Annual review of pharmacology and toxicology*, Jg. 35, S. 93–127.
- Watson, S. R.; Chang, Y. F.; O'Connell, D.; Weigand, L.; Ringquist, S.; Parma, D. H. (2000): Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo. In: *Antisense & nucleic acid drug development*, Jg. 10, H. 2, S. 63–75.
- Willis, M. C.; Collins, B. D.; Zhang, T.; Green, L. S.; Sebesta, D. P.; Bell, C. et al. (1998): Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. In: *Bioconjugate chemistry*, Jg. 9, H. 5, S. 573–582.
- White, R.R., B.A. Sullenger, and C.P. Rusconi, Developing aptamers into therapeutics. *J Clin Invest*, 2000. Jg. 106, H. 8, S. 929–34.
- Winkler, W. C.; Cohen-Chalamish, S.; Breaker, R. R. (2002): An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 99, H. 25, S. 15908–15913.
- WHO: Report of the Scientific Working Group on Chagas' disease, 2005. World Health Organization. www.who.int/tdr/diseases/chagas/swg_chagas.pdf
- WHO: Leishmaniasis - Magnitude of the Problem. World Health Organization. www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html.
- WHO: African trypanosomiasis Fact sheet No. 259 (August 2006). World Health Organization. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/
- WHO: Strategic Direction for African Trypanosomiasis Research (Februar 2002). World Health Organization. www.who.int/tdr/diseases/trypan/direction.htm
- WHO: Malaria Fact sheet No. 94 (Mai 2006). World Health Organization. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/

- Wu, Q.; Tsiang, M.; Sadler, J. E. (1992): Localization of the single-stranded DNA binding site in the thrombin anion-binding exosite. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 267, H. 34, S. 24408–24412.
- Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W. (2001): Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. In: *Biophysical journal*, Jg. 81, H. 3, S. 1475–1485.
- Younes, C. K.; Boisdard, R.; Tavitian, B. (2002): Labelled oligonucleotides as radiopharmaceuticals: pitfalls, problems and perspectives. In: *Current pharmaceutical design*, Jg. 8, H. 16, S. 1451–1466.
- Zacharias, M.; Engels, J. W. (2004): Influence of a fluorobenzene nucleobase analogue on the conformational flexibility of RNA studied by molecular dynamics simulations. In: *Nucleic acids research*, Jg. 32, H. 21, S. 6304–6311.

8 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
%	Prozent
ϵ	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
μ	mikro
ΔG	Gibb'sche freie Energie
ΔH	Reaktionsenthalpie
ΔS	Entropieänderung
<	kleiner
>	größer
A	Absorption
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ci	Curie
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	Tage
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	et alterii = und andere
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
<i>in vitro</i>	im Laborgefäß
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
J	Joule
K_d	Gleichgewichts-Dissoziationkonstante
kDa	Kilodalton
M	Mol pro Liter

MALDI-ToF	Matrix-assisted laser desorption ionization – Time of Flight
min	Minute
MITat	Molteno Institute Trypanozoon antigenic type
Mol	$6,023 \cdot 10^{23}$ Teilchen
mPEG	Monomethoxypolyethylenglycol
mPEG-NH ₂	O-(Aminoethyl) O'-Methylpolyethylenglycol
n	nano
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLDA	Poly(Lysin Dodecanamid)
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
PPAS	Poly(2-Propylacrylsäure)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (ca. 20°C)
sec	Sekunde
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T	Temperatur
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
T _m	Schmelzpunkt
tRNA	Transfer-RNA
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

9 Eidesstattliche Erklärung

Hierdurch erkläre ich an Eides Statt, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe. Die vorliegende Dissertation habe ich selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt.

Darmstadt, den 31. Mai 2007

Annette Adler

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Annette Adler
geboren: 29. März 1976
in: Groß-Gerau

Schulausbildung

1982 – 1986	Grundschule, Peter-Schöffers Schule in Gernsheim
1986 – 1988	Förderstufe, Johannes-Gutenberg-Schule in Gernsheim
1988 – 1995	Gymnasium Gernsheim
1995	Allgemeine Hochschulreife

Universitätsausbildung

1995 – 1996	Studium Mathematik und Geschichte für das höhere Lehramt an der Technischen Universität Darmstadt
1996 – 2002	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
1998	Vordiplom Biologie
06/2001 – 03/2002	Anfertigung der Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. H. U. Göringer am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt. Titel: „Das La-Protein als Aptamer-bindendes Protein auf der Oberfläche von <i>Trypanosoma brucei brucei</i> “
08/2002	Abschluss des Studiums der Biologie als Diplom-Biologin an der Technischen Universität Darmstadt.
10/2002- 03/2007	Anfertigung der Dissertation im Labor von Prof. Dr. H. U. Göringer am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt. Titel: „Die post-SELEX Optimierung des Trypanosomen-spezifischen RNA-Aptamers 2-16“

Beruflicher Werdegang

seit 04/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe „Angewandte Virologie und Gentherapie“ unter der Leitung von Prof. Dr. D. von Laer am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main.
--------------	---

11 Danksagung

Danke...

Uli Göringer, für die vielen Jahre in deinem Labor. Diese Zeit hat nicht unwesentlich dazu beigetragen, einige entscheidende Weichen in meinem Leben zu stellen.

Prof. Dr. Harald Kolmar, für die spontane und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens für diese Arbeit.

Prof. Dr. Michael Reggelin für die Hilfe bei den chemischen Synthesen.

Alex Best, Angelika Schmidt, Anne Fuß, Elisabeth Kruse, Elke Schlüter, Henning Hofmann, Heike Kaibel, Ingrid Müller, Kerstin Weitzel, Mattes Homann, Michael Brecht, Moritz Niemann, Tobi Lengfeld und ganz besonders **Cordula Böhm** für helfende Hände, offene Ohren, alternative Blickwinkel, tröstende Worte, lange Nächte und viel, viel Spaß - auch bei der Arbeit.

Was hätte ich nur ohne euch getan!?!

Fabian Giehler und **Nicole Forster** für flinke Finger und Datenberge.

Fozzie, für den Beweis, dass die Grenzen der Geduld immer wieder neu gesteckt werden können.